

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

# Off nlegungsschrift DE 3122499 A1

②1 Aktenzeichen:  
②2 Anmeldetag:  
②3 Offenlegungstag:

P 31 22 499.7  
5. 6. 81  
24. 12. 81

⑤1 Int. Cl. 3:  
**C07C 69/33**  
C 07 D 309/30  
C 12 P 7/62  
C 12 P 17/06  
A 61 K 31/365  
A 61 K 31/22

DE 3122499 A1

③4 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1  
06.06.80 JP P76127-80 22.08.80 JP P115483-80  
08.09.80 JP P124385-80 19.09.80 JP P130311-80

⑦2 Erfinder:

Terahara, Akira, Dr., Tokyo, JP; Tanaka, Minoru, Dr., Chiba, JP

⑦1 Anmelder:

Sankyo Co., Ltd., Tokyo, JP

⑦4 Vertreter:

von Föner, A., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Strahl, P., Dipl.-Ing.  
Dipl.-Wirtsch.-Ing.; Schübel-Hopf, U., Dipl.-Chem.  
Dr.rer.nat.; Ebbinghaus, D., Dipl.-Ing.; Finck, K., Dipl.-Ing.  
Dr.-Ing., Pat.-Anw., 8000 München

⑤4 Neues Derivate von ML-238B, Verfahren zu ihrer Herstellung und diese Derivate enthaltende Arzneimittelzubereitungen

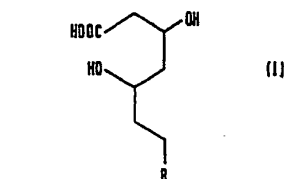
Verbindungen der Formel (I)

(1. Formel)

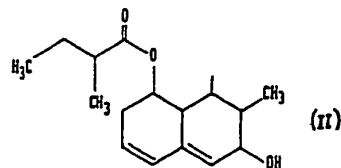
worin R eine Gruppe der Formel

(2. Formel)

bedeutet, sowie die entsprechenden durch Ringschluß gebildeten Lactone, die Salze (insbesondere Alkalimetallsalze) und Ester (speziell C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkylester) dieser Verbindungen können hergestellt werden, indem die Substanzen ML-236B oder ML-236B-Carbonsäure oder deren Salze oder Ester einer enzymatischen Hydroxylierung unterworfen werden, die mit Hilfe von Mikroorganismen der Genera Mucor, Rhizopus, Zygorhynchus, Circinella, Actinomucor, Gongronella, Phycomyces, Martirella, Pycnoporus, Rhizoctonia, Absidia, Cunninghamella, Syncephalastrum und Streptomyces oder zellfreien enzymhaltigen Extrakten aus diesen Mikroorganismen durchgeführt werden kann. Diese Verbindungen sind befähigt, die Biosynthese von Cholesterin zu inhibieren und eignen sich daher zur Behandlung der Hypercholesterämie. (31 22 499 - 24.12.1981)



oder



DE 3122499 A1

PATENTANWÄLTE  
SCHIFF v. FÜNER STREHL SCHÜBEL-HOPF EBBINGHAUS FINCK

MARIAHILFPLATZ 2 & 3, MÜNCHEN 90  
POSTADRESSE: POSTFACH 95 0160, D-8000 MÜNCHEN 95

3122499

ALSO PROFESSIONAL REPRESENTATIVES  
BEFORE THE EUROPEAN PATENT OFFICE

KARL LUDWIG SCHIFF (1964 - 1978)  
DIPL. CHEM. DR. ALEXANDER v. FÜNER  
DIPL. ING. PETER STREHL  
DIPL. CHEM. DR. UNSUIA SCHÜBEL-HOPF  
DIPL. ING. DIETER EBBINGHAUS  
DR. ING. DIETER FINCK

TELEFON (089) 482084  
TELEX 5-29885 AURO D  
TELEGRAMME AUROMARCPAT MÜNCHEN

SANKYO COMPANY LIMITED

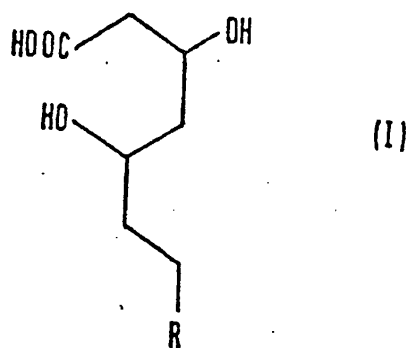
DEA-13 579

5. Juni 1981

Neue Derivate von ML-236B, Verfahren zu  
ihrer Herstellung und diese Derivate enthal-  
tende Arzneimittelzubereitungen

PATENTANSPRÜCHE  
=====

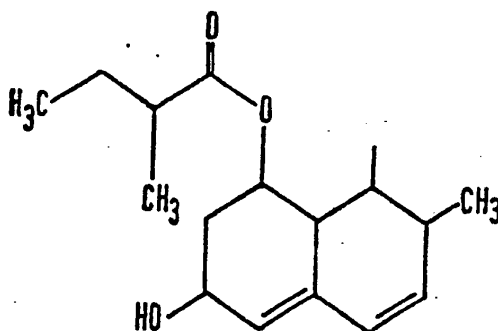
1.) Verbindungen der Formel (I) :



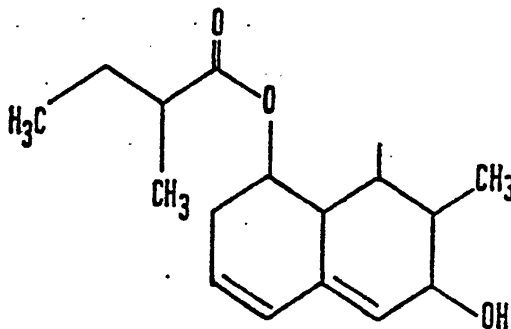
130052/0869

3122499

in der R für eine Gruppe der nachstehenden Formeln steht



oder



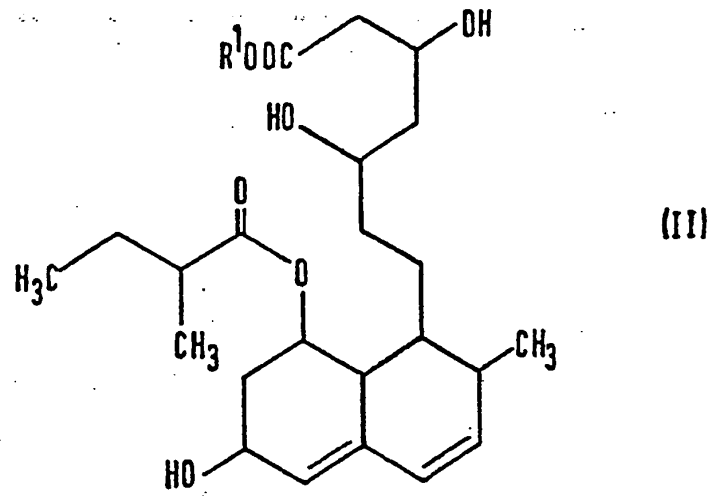
sowie die durch Ringschluß gebildeten Lactone und Salze  
und Ester dieser Verbindungen.

2. Verbindungen gemäß Anspruch 1 der Formel (II)

130052/0060

05.05.81

3122499



worin  $R^1$  ein Wasserstoffatom oder eine  $C_1$ - $C_5$ -Alkylgruppe bedeutet, sowie pharmazeutisch geeignete Salze der Säure, in der  $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet.

3. Verbindungen nach Anspruch 2, worin  $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet.

4. Verbindungen nach Anspruch 2, worin  $R^1$  eine  $C_1$ - $C_5$ -Alkylgruppe bedeutet.

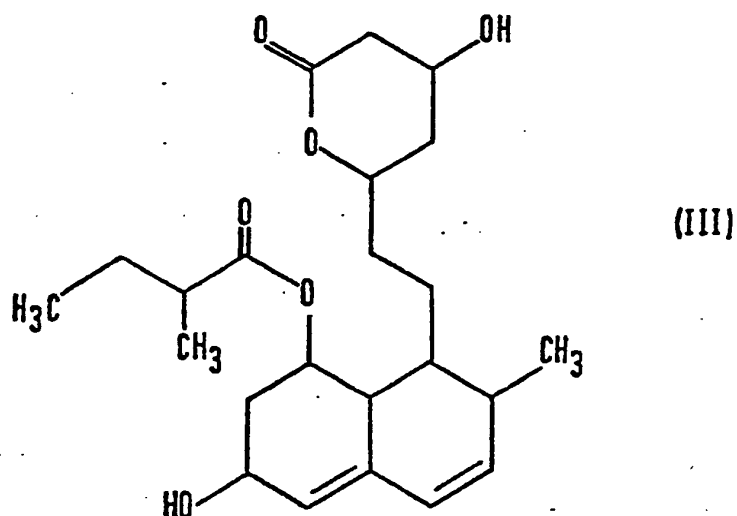
5. Verbindungen nach Anspruch 2, worin  $R^1$  eine Methylgruppe bedeutet.

6. Verbindungen nach Anspruch 2 in Form der Alkalimetallsalze.

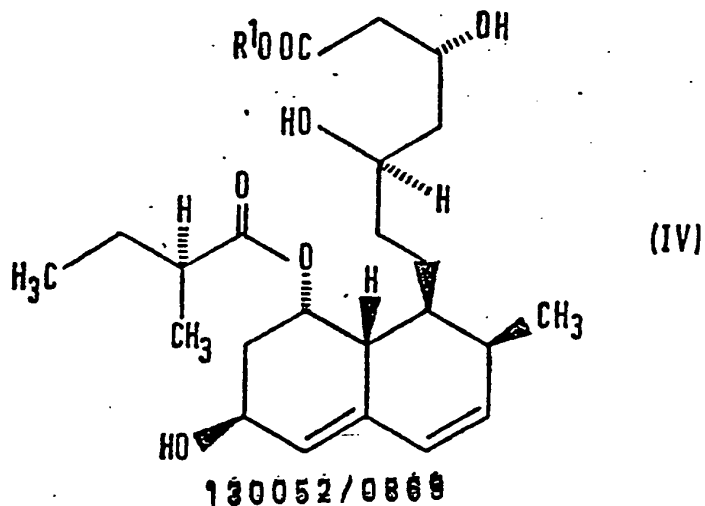
130052/0869

7. Verbindungen nach Anspruch 6 in Form des Natrium-  
salzes.

8. Verbindung nach Anspruch 1 der Formel (III)



9. Verbindungen nach Anspruch 2 der in Formel (IV) ge-  
zeigten sterischen Konfiguration :



05.08.81

- 5 -

3122499

worin  $R^1$  die in Anspruch 2 gegebene Definition hat, sowie deren pharmazeutisch geeignete Salze.

10. Verbindungen nach Anspruch 9, worin  $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet.

11. Verbindungen nach Anspruch 9, worin  $R^1$  eine  $C_1-C_5$ -Alkylgruppe bedeutet.

12. Verbindungen nach Anspruch 9, worin  $R^1$  eine Methylgruppe bedeutet.

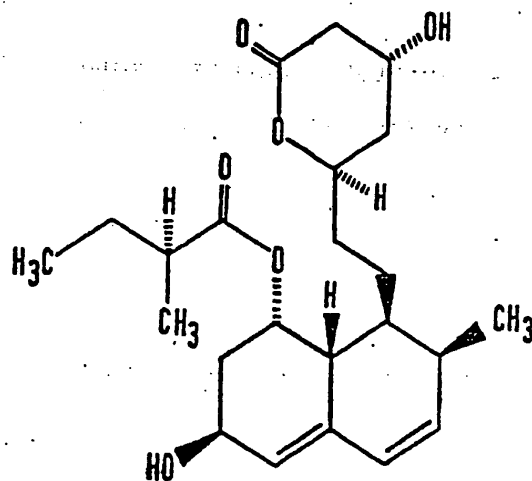
13. Verbindungen nach Anspruch 9 in Form der Alkalimetallsalze.

14. Verbindungen nach Anspruch 13 in Form des Natriumsalzes.

15. Verbindung nach Anspruch 8 mit der in Formel (V) gezeigten sterischen Konfiguration :

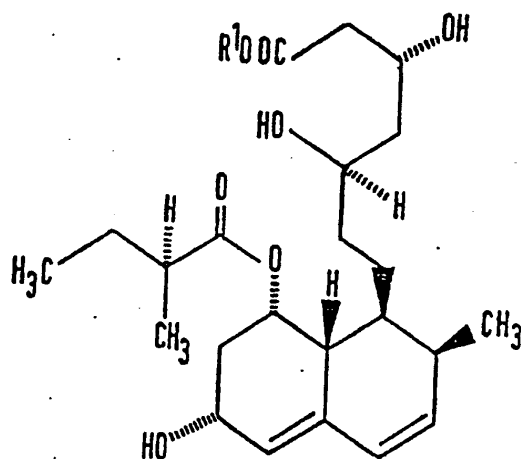
130052/0889

3122499



(V)

16. Verbindungen nach Anspruch 2 mit der in Formel (VI) gezeigten sterischen Konfiguration :



(VI)

worin R<sup>1</sup> die in Anspruch 2 gegebene Definition hat, sowie deren pharmazeutisch geeignete Salze.

17. Verbindungen nach Anspruch 16, worin R<sup>1</sup> ein Wasser-

130052/0888

3122499

stoffatom bedeutet.

stoffatom bedeutet.

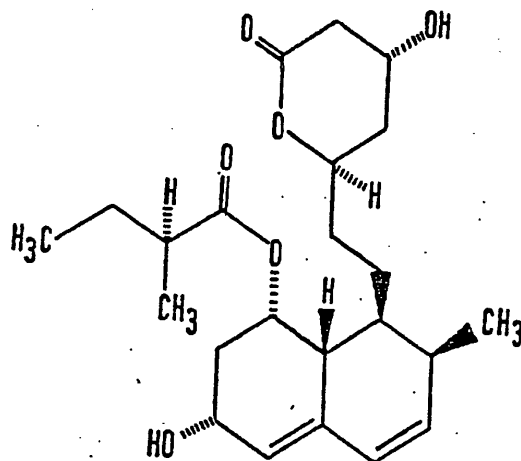
18. Verbindungen nach Anspruch 16, worin  $R^1$  eine  $C_1-C_5$ -Alkylgruppe bedeutet.

19. Verbindungen nach Anspruch 16, worin  $R^1$  eine Methylgruppe bedeutet.

20. Verbindungen nach Anspruch 16 in Form der Alkalimetallsalze.

21. Verbindungen nach Anspruch 20 in Form des Natriumsalzes.

22. Verbindung nach Anspruch 8 mit der in Formel (VII) gezeigten sterischen Konfiguration :

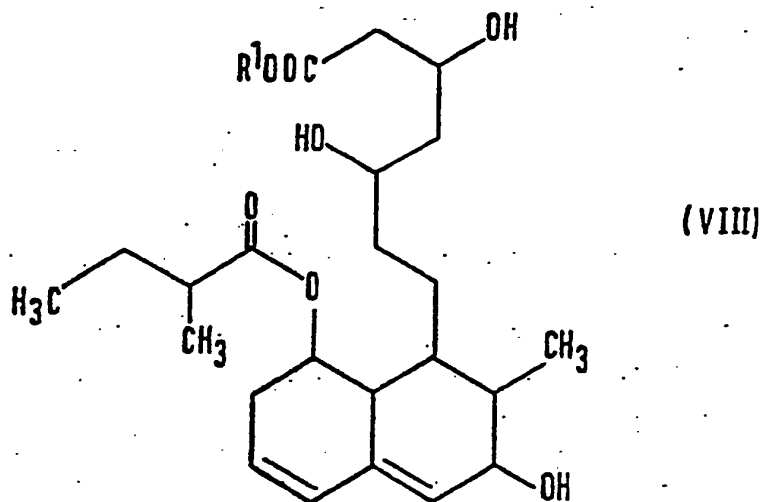


(VII)

130052/0868



23. Verbindungen nach Anspruch 1 der Formel (VIII) :



worin  $R^1$  ein Wasserstoffatom oder eine  $C_1$ - $C_5$ -Alkylgruppe bedeutet, sowie pharmazeutisch geeignete Salze der Säure, in der  $R^1$  ein Wasserstoffatom darstellt.

24. Verbindungen nach Anspruch 23, worin  $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet.

25. Verbindungen nach Anspruch 23, worin  $R^1$  eine  $C_1$ - $C_5$ -Alkylgruppe bedeutet.

26. Verbindungen nach Anspruch 23, worin  $R^1$  eine Methylgruppe bedeutet.

15.05.81

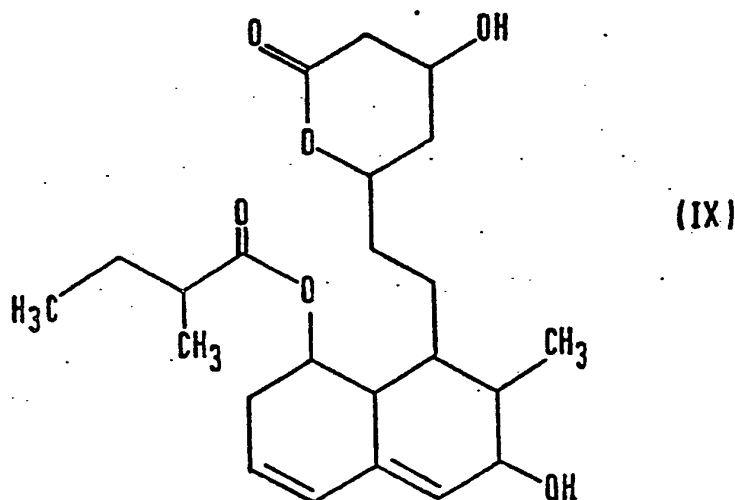
- 9 -

3122499

27. Verbindungen nach Anspruch 23 in Form der Alkali-  
metallsalze.

28. Verbindungen nach Anspruch 27 in Form des Natrium-  
salzes.

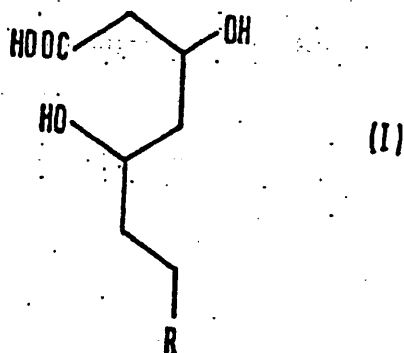
29. Verbindung nach Anspruch 1 der Formel (IX) :



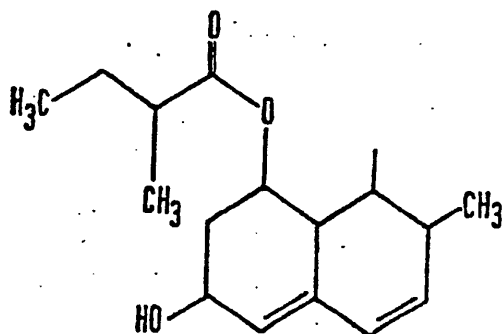
30. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der  
Formel (I) :

130052/0860

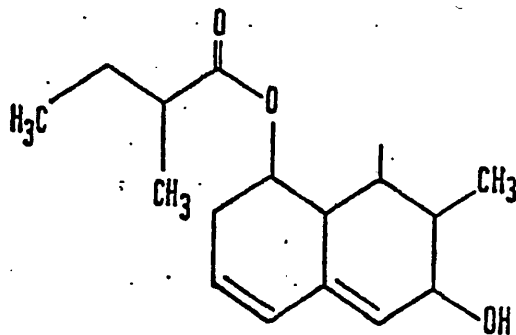
3122499



in der R für eine Gruppe der Formel



oder



130052/0868

05 15 81

3122499

steht,

sowie die durch Ringschluß gebildeten Lactone und Salze und Ester dieser Verbindungen, dadurch g e k e n n - z e i c h n e t , daß man als Substrat eine der Substanzen ML-236B, ML-236B-carbonsäure oder deren Salz oder Ester enzymatisch hydroxyliert.

31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch g e k e n n - z e i c h n e t , daß man die enzymatische Hydroxylierung mit Hilfe eines Mikroorganismus, der aus Mikroorganismen der Genera Mucor, Rhizopus, Zygorynchus, Circinella, Actinomucor, Gongronella, Phycomyces, Martierella, Pycnopus, Rhizoctonia, Absidia, Cunninghamella, Syncephalastrum und Streptomyces ausgewählt ist oder mit Hilfe eines zellfreien enzymhaltigen Extrakts aus diesen Mikroorganismen durchführt.

32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch g e k e n n - z e i c h n e t , daß man einen der folgenden Mikroorganismen verwendet :

Absidia coerulea

Cunninghamella echinulata

Syncephalastrum racemosum

Streptomyces roseochromogenus

130052/0869

3122499

Mucor hiemalis f. hiemalis

Mucor bacilliformis

Mucor circinelloides f. circinelloides

Mucor hiemalis f. corticolus

Mucor dimorphosporus

Mucor fragilis

Mucor genevensis

Mucor globosus

Mucor circinelloides f. griseo-cyanus

Mucor heterosporus

Mucor spinescens

Rhizopus chinensis

Rhizopus circinans

Rhizopus arrhizus

Zygorynchus moelleri

Circinella muscae

Circinella rigida

Circinella umbellata

Actinomucor elegans

Phycomyces blakesleeana

Martierella isabellina

Gongronella butleri

Pycnopus coccineus

Rhizoctonia solani

Syncephalastrum nigricans

Absidia glauca var. paradoxa

130052/0000

05.05.81

3122499

33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß man einen der folgenden Mikro-  
organismen verwendet :

- Absidia coerulea IF0-4423
- Cunninghamella echinulata IF0-4445
- Cunninghamella echinulata IF0-4444
- Cunninghamella echinulata ATCC-9244
- Syncephalastrum racemosum IF0-4814
- Syncephalastrum racemosum IF0-4828
- Streptomyces roseochromogenus NRRL-1233
- Streptomyces roseochromogenus IF0-3363
- Streptomyces roseochromogenus IF0-3411
- Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-5834
- Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-5303
- Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-8567
- Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-8449
- Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-8448
- Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-8565
- Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-117.08
- Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-109.19
- Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-200.28
- Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-242.35
- Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-110.19

130052/0869

3122499

Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-201.65  
Mucor bacilliformis NRRL-2346  
Mucor circinelloides f. circinelloides IFO-4554  
Mucor circinelloides f. circinelloides IFO-5775  
Mucor hiemalis f. corticolus NRRL-12473  
Mucor dimorphosporus IFO-4556  
Mucor fragilis CBS-236.35  
Mucor genevensis IFO-4585  
Mucor globosus NRRL-12474  
Mucor circinelloides f. griseo-cyanus IFO-4563  
Mucor heterosporus NRRL-3154  
Mucor spinescens IAM-6071  
Rhizopus chinensis IFO-4772  
Rhizopus circinans ATCC-1225  
Rhizopus arrhizus ATCC-11145  
Zygorynchus moelleri IFO-4833  
Circinella muscae IFO-4457  
Circinella rigida NRRL-2341  
Circinella umbellata NRRL-1713  
Circinella umbellata IFO-4452  
Circinella umbellata IFO-5842  
Phycomyces blakesleeana NRRL-12475  
Martierella isabellina IFO-6739  
Gongronella butleri IFO-8080  
Pycnoporus coccineus NRRL-12476  
Rhizoctonia solani NRRL-12477

13006270860

Syncephalastrum nigricans NRRL-12478

Syncephalastrum nigricans NRRL-12479

Syncephalastrum nigricans NRRL-12480

Absidia glauca var. paradoxa IFO-4431

Actinomucor elegans ATCC-6476

34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß man aus dem Reaktionsgemisch eine  
Verbindung aus der Gruppe M-4, M-4', IsoM-4, IsoM-4',  
ein Salz, einen Ester oder ein Lacton von M-4, M-4',  
IsoM-4 oder IsoM-4' oder ein Gemisch solcher Verbindun-  
gen abtrennt.

35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß der Ester ein C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkylester ist.

36. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß der Ester ein Methylester ist.

37. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß das Salz ein Alkalimetallsalz ist.

38. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß das Salz ein Natriumsalz ist.



39. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß ein Mikroorganismus aus der nachstehenden Gruppe von Mikroorganismen verwendet wird:

Absidia coerulea

Cunninghamella echinulata

Syncephalastrum racemosum

Mucor hiemalis f. hiemalis

Mucor bacilliformis

Mucor circinelloides f. circinelloides

Mucor hiemalis f. corticolus

Mucor dimorphosporus

Mucor fragilis

Mucor genevensis

Mucor globosus

Mucor circinelloides f. griseo-cyanus

Mucor heterosporus

Mucor spinescens

Pycnoporus coccineus

Rhizoctonia solani

Syncephalastrum nigricans

40. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß ein Mikroorganismus aus der folgenden Gruppe verwendet wird:

05-08-81

- 17 -

3122499

Absidia coerulea IF0-4423  
Cunninghamella echinulata IF0-4445  
Cunninghamella echinulata IF0-4444  
Cunninghamella echinulata ATCC-9244  
Syncephalastrum racemosum IF0-4814  
Syncephalastrum racemosum IF0-4828  
Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-5834  
Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-5303  
Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-8567  
Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-8449  
Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-8448  
Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-8565  
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-117.08  
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-109.19  
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-200.28  
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-242.35  
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-110.19  
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-201.65  
Mucor bacilliformis NRRL-2346  
Mucor circinelloides f. circinelloides IF0-4554  
Mucor circinelloides f. circinelloides IF0-5775  
Mucor hiemalis f. corticolus NRRL-12473  
Mucor dimorphosporus IF0-4556  
Mucor fragilis CBS-236.35  
Mucor genevensis IF0-4585

130052/0869

Mucor globosus NRRL-12474

Mucor circinelloides f. griseo-cyanus IF0-4563

Mucor heterosporus NRRL-3154

Mucor spinescens IAM-6071

Pycnoporus coccineus NRRL-12476

Rhizoctonia solani NRRL-12477

Syncephalastrum nigricans NRRL-12478

Syncephalastrum nigricans NRRL-12479 and

Syncephalastrum nigricans NRRL-12480.

41. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß man einen Mikroorganismus aus der  
nachstehenden Gruppe von Mikroorganismen verwendet:

Mucor hiemalis f. hiemalis

Mucor circinelloides f. circinelloides

Mucor fragilis

Mucor genevensis

Mucor circinelloides f. griseo-cyanus

Pycnoporus coccineus and

Rhizoctonia solani.

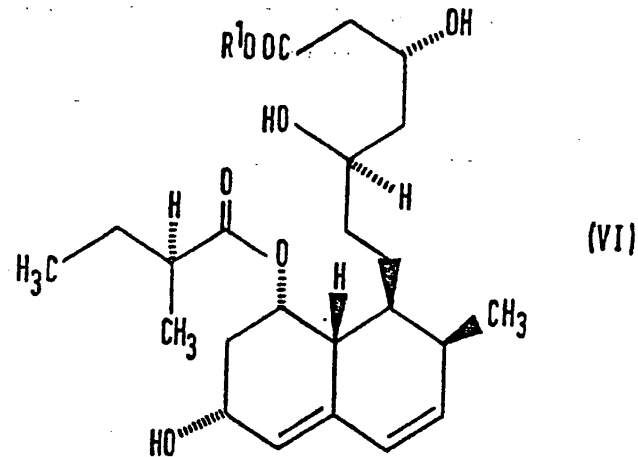
42. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß man einen Mikroorganismus aus der  
Gruppe Syncephalastrum nigricans

05-08-81

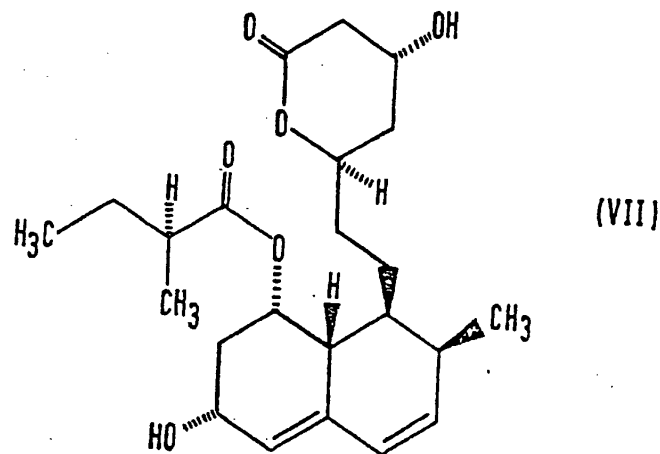
- 19 -

3122499

und *Syncephalastrum racemosum* verwendet und Verbindungen der Formel (VI)



worin  $R^1$  ein Wasserstoffatom oder eine  $C_1$ - $C_5$ -Alkylgruppe bedeutet, pharmazeutisch geeignete Salze der Säure, worin  $R^1$  ein Wasserstoffatom darstellt oder eine Verbindung der Formel (VII)



herstellt.

130052/0868

43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß  $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet.

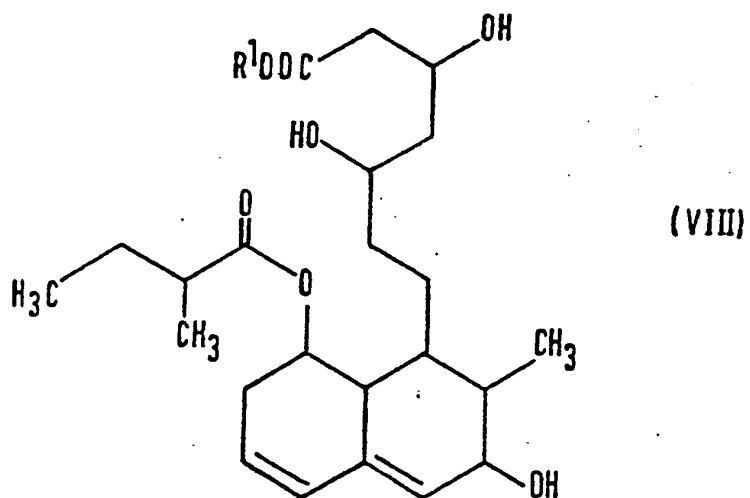
44. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß  $R^1$  eine  $C_1$ - $C_5$ -Alkylgruppe bedeutet.

45. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß  $R^1$  eine Methylgruppe bedeutet.

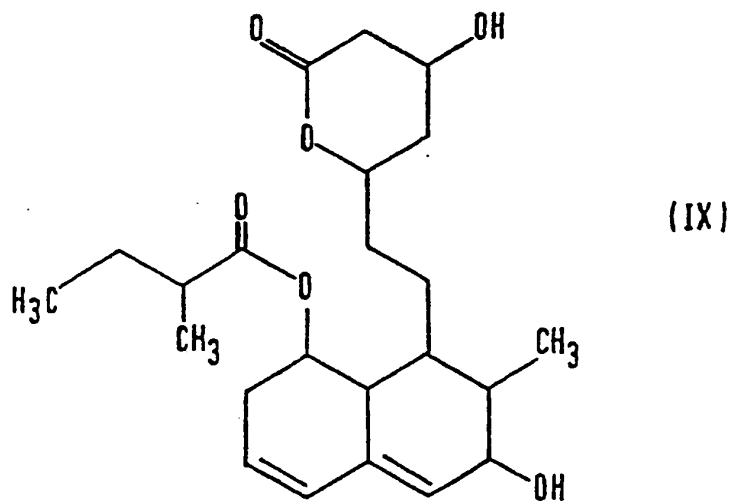
46. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß das Salz ein Alkalimetallsalz ist.

47. Verfahren nach Anspruch 46, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß das Salz ein Natriumsalz ist.

48. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß ein Mikroorganismus aus der Gruppe  
Absidia coerulea und Cunninghamella echinulata verwendet  
wird und eine Verbindung aus der Gruppe der Verbindungen  
der Formel (VIII)



worin  $R^1$  ein Wasserstoffatom oder eine  $C_1$ - $C_5$ -Alkylgruppe bedeutet, pharmazeutisch geeignete Salze der Säure, in der  $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet, und Verbindungen der Formel (IX)



hergestellt wird.

49. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß  $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet.

50. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß  $R^1$  eine  $C_1$ - $C_5$ -Alkylgruppe bedeutet.

51. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß  $R^1$  eine Methylgruppe bedeutet.

52. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß das Salz ein Alkalimetallsalz ist.

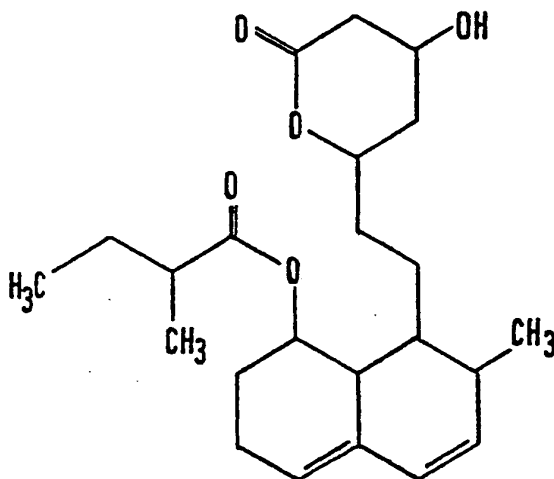
53. Verfahren nach Anspruch 52, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t , daß das Salz ein Natriumsalz ist.

54. Arzneimittel mit Wirksamkeit zur Inhibierung der  
Biosynthese von Cholesterin, enthaltend einen Wirkstoff  
sowie gegebenenfalls übliche Arzneimittelzusätze bzw.  
Trägersubstanzen, dadurch g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß es als Wirkstoff eine Verbindung gemäß einem der  
Ansprüche 1 bis 29 enthält.

BESCHREIBUNG:

Die Erfindung betrifft eine Reihe neuer Derivate der an sich bekannten Verbindung ML-236B, Verfahren zu ihrer Herstellung und pharmazeutische Zubereitungen, welche diese Verbindungen als Wirkstoffe enthalten.

Die Verbindung ML-236B, welche die nachgestehende chemische Strukturformel besitzt:



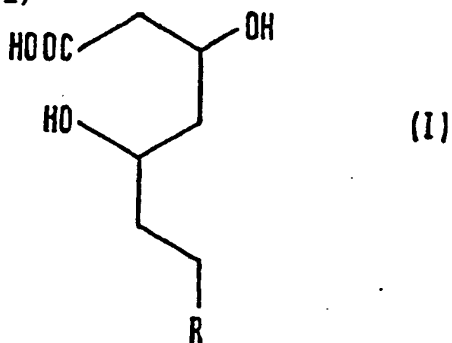
ist in der US-PS 3 983 140 beschrieben. Sie wurde aus den Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen des Genus *Penicillium*, insbesondere *Penicillium citrinum*, einer Blauschimmel-Spezies, isoliert und in gereinigter Form erhalten. Es hat sich gezeigt, daß diese Verbindung die Biosynthese von Cholesterin durch Enzyme oder Zellkulturen, die von Versuchstieren abgetrennt wurden, inhibiert, indem sie mit dem geschwindigkeitsbegrenzenden, bei der Biosynthese



des Cholesterins aktiven Enzym, nämlich 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase konkurriert und infolgedessen den Serum-Cholesterinspiegel von Tieren drastisch vermindert (Journal of Antibiotics, 29, 1346 (1976)). Eine Anzahl von Verbindungen mit strukturellem Zusammenhang mit ML-236B wurden ebenfalls aufgefunden und haben sich als befähigt zur Inhibierung der Biosynthese des Cholesterins erwiesen.

Erfindungsgemäß wird nun eine Reihe von neuen Verbindungen zur Verfügung gestellt, die durch enzymatische Hydroxylierung von ML-236B oder dessen Derivaten hergestellt werden können, und die eine Fähigkeit zur Inhibierung der Biosynthese von Cholesterin besitzen, die mindestens mit der von ML-236B selbst vergleichbar ist und diese in einigen Fällen wesentlich überschreitet.

Gegenstand der Erfindung sind somit Hydroxycarbonsäuren der Formel (I)

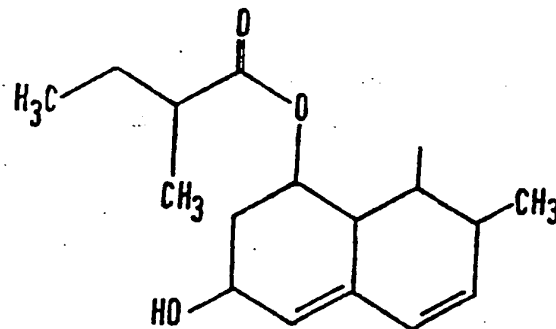


worin R eine Gruppe der Formel

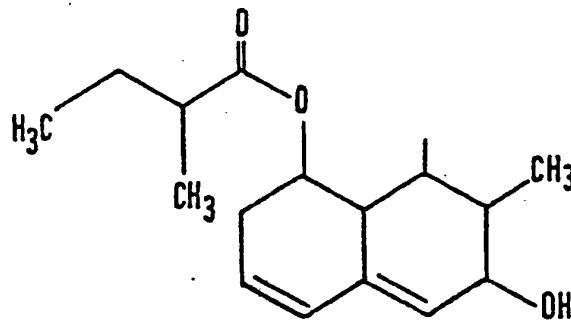
05.06.81

- 25 -

3122499



oder



bedeutet,

sowie unter Ringschluß gebildete Lactone und Salze und Ester dieser Verbindungen.

Gegenstand der Erfindung ist außerdem ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel (I), deren durch Ringschluß gebildete Lactone, sowie deren Salze oder Ester, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man ML-236B oder ML-236B-carbonsäure oder deren Salze oder Ester der enzymatischen Hydroxylierung unterwirft.

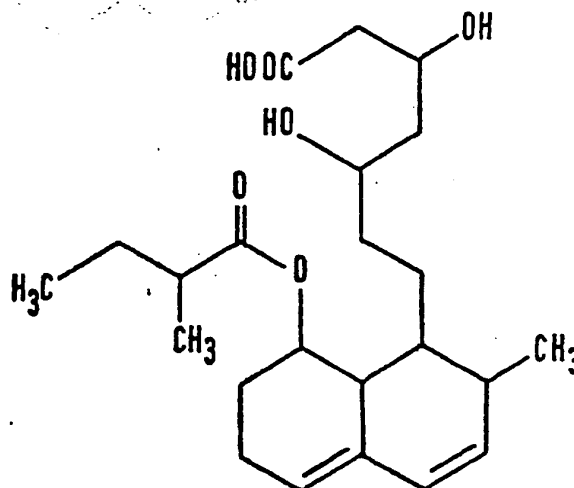
ML-236B-carbonsäure entspricht folgender Formel

130052/0869

05 05 01

3122499

- 26 -



Gegenstand der Erfindung sind darüber hinaus Arzneimittel, die sich zur Behandlung der Hypercholesteräemie eignen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie als Wirkstoff eine oder mehr Verbindungen der vorstehend definierten Formel I oder die entsprechenden durch Ringschluß gebildeten Lactone, Salze oder Ester, soweit diese Derivate pharmazeutisch verträglich sind, enthalten.

Die Erfindung wird nachstehend ausführlicher erläutert.

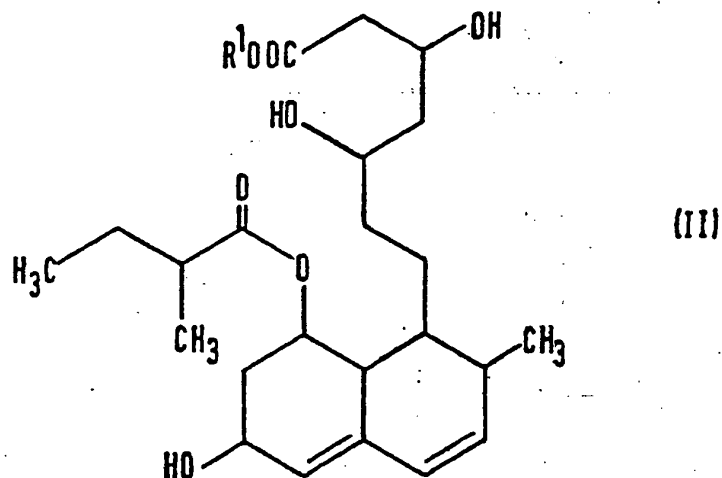
Eine Klasse der erfindungsgemäßen Verbindungen sind Verbindungen der Formel (II)

130052/0869

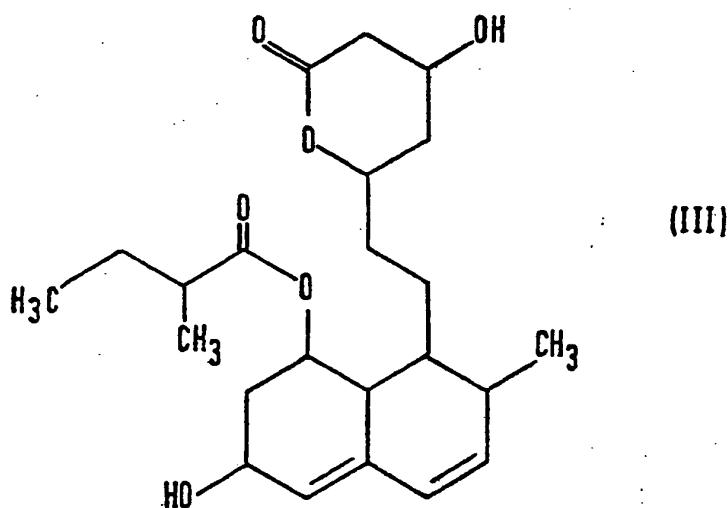
05-08-81

- 27 -

3122499



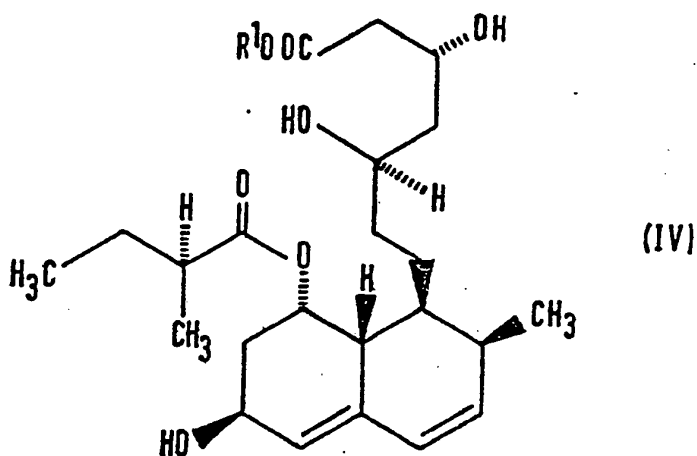
worin R<sup>1</sup> ein Wasserstoffatom oder eine C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkylgruppe bedeutet,  
pharmazeutisch geeignete Salze der Säure, falls R<sup>1</sup> ein Wasserstoffatom darstellt und das entsprechende Lacton der Formel (III)



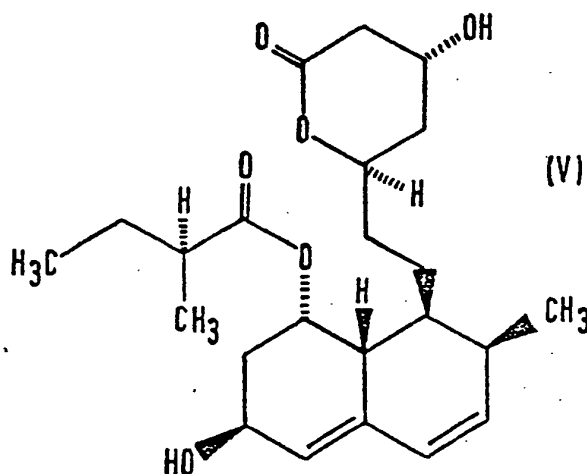
130052/0868

Im Hinblick auf die Anzahl von asymmetrischen Kohlenstoffatomen in diesen Verbindungen sind zahlreiche geometrische Isomere möglich. Unter diesen sind folgende Isomere am wichtigsten:

Verbindungen der Formel (IV):



worin  $R^1$  die vorstehend gegebene Definition hat, und pharmazeutisch geeignete Salze der Säure, wenn  $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet, und das entsprechende Lacton der Formel (V)

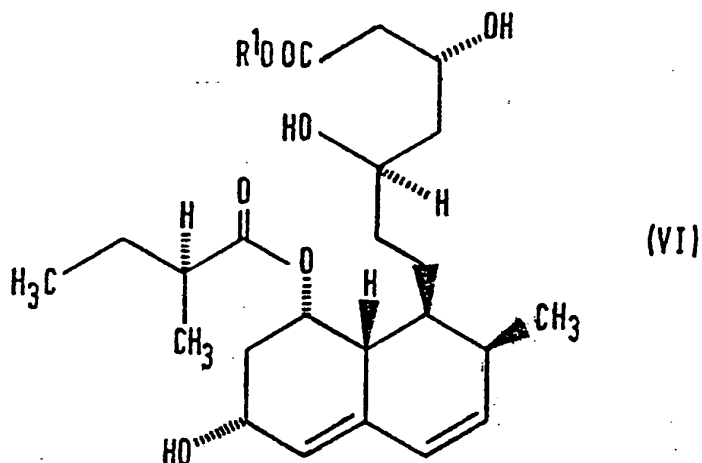


05.06.81

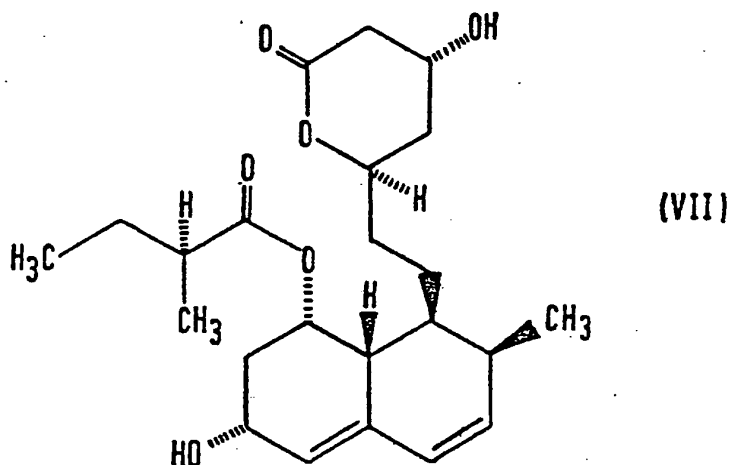
- 29 -

3122499

sowie Verbindungen der Formel (VI)



in der R<sup>1</sup> die vorstehend gegebene Definition hat, sowie pharmazeutisch geeignete Salze der Säure, wenn R<sup>1</sup> ein Wasserstoffatom bedeutet, und das entsprechende Lacton der Formel (VII)

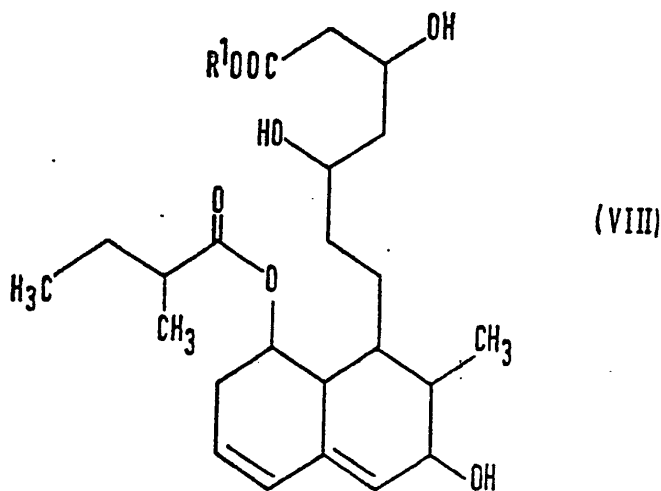


130052/0869

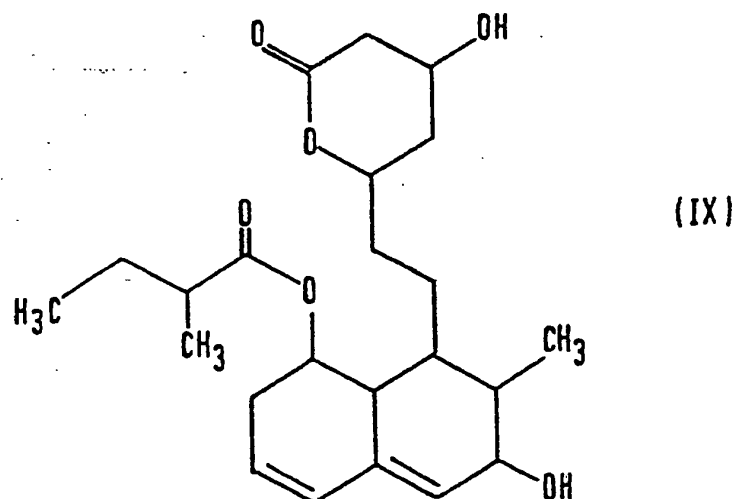
Die Hydroxycarbonsäure der Formel (IV), in der  $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet, wird in dieser Beschreibung und den Patentansprüchen auch abgekürzt als M-4 bezeichnet und Derivate dieser Säure, insbesondere ihre Salze und Ester, werden als Derivate von M-4 bezeichnet, während das entsprechende Lacton der Formel (V) als M-4-Lacton bezeichnet wird.

In entsprechender Weise wird die Hydroxycarbonsäure der Formel (VI), in der  $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet, als M-4' benannt und Derivate dieser Säure werden als Derivate von M-4' bezeichnet, während das entsprechende Lacton der Formel (VII) als M-4'-Lacton bezeichnet wird.

Eine weitere bevorzugte Klasse von Verbindungen gemäß der Erfindung sind Verbindungen der Formel (VIII)

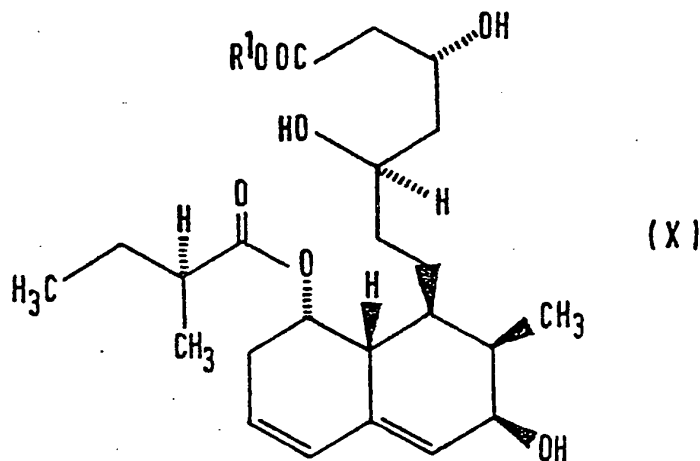


worin  $R^1$  die vorstehend gegebene Definition hat, sowie pharmazeutisch geeignete Salze der Säure, in der  $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet und das entsprechende Lacton der Formel (IX)



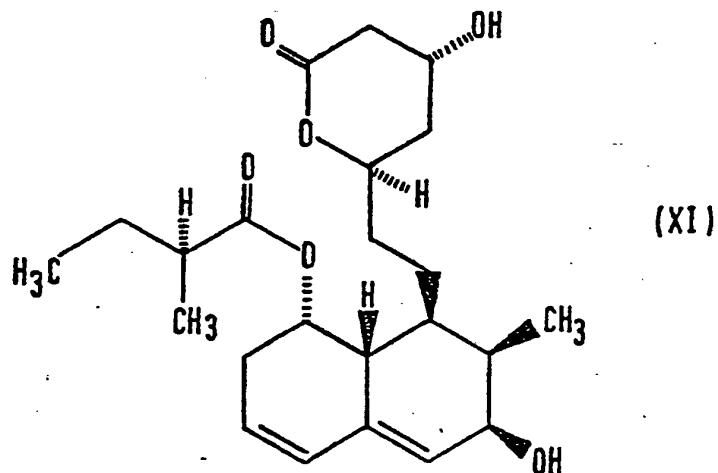
Darüber hinaus ist eine Vielfalt von geometrischen Isomeren dieser Verbindungen möglich, deren wichtigste nachstehend angegeben sind:

Verbindungen der Formel (X):

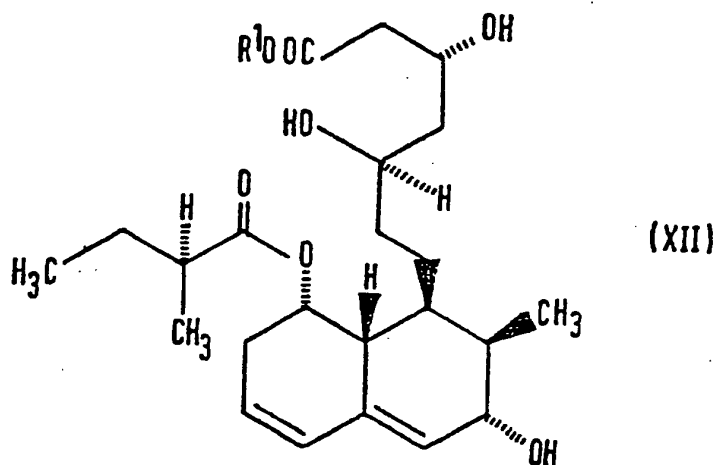




worin  $R^1$  die vorstehend gegebene Definition hat,  
und pharmazeutisch geeignete Salze der Säure, in  
der  $R^1$  ein Wasserstoffatom darstellt und das ent-  
sprechende Lacton der Formel (XI)



und Verbindungen der Formel (XII)

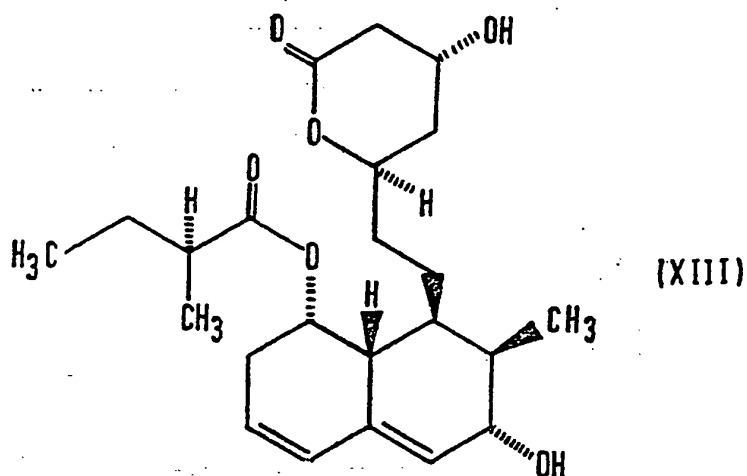


in der  $R^1$  die vorstehend gegebene Definition hat,  
und pharmazeutisch geeignete Salze der Säure, in der  
 $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet, sowie das entspre-  
chende Lacton der Formel (XIII):

05.05.81

- 33 -

3122499



Die Säure der Formel (X) wird in dieser Beschreibung und den Patentansprüchen kurz als IsoM-4 bezeichnet, und ihre Derivate, wie Salze und Ester, werden als Derivate von IsoM-4 bezeichnet, während das entsprechende Lacton der Formel (XI) als IsoM-4-Lacton benannt wird.

Die Säure der Formel (XII), worin  $R^1$  ein Wasserstoffatom bedeutet, wird kurz als IsoM-4' und ihre Derivate werden als Derivate von IsoM-4' bezeichnet, während das entsprechende Lacton der Formel (XIII) als IsoM-4'-Lacton abgekürzt wird.

Unter den Estern der Hydroxycarbonsäuren der Formel (I) werden die  $(C_1-C_5)$ -Alkylester bevorzugt. Diese Alkylgruppen können geradekettige oder verzweigte Gruppen sein und umfassen beispielsweise Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Isopropyl-, Butyl- und Isobutylgruppen, wobei die Methylgruppe speziell bevorzugt wird.

Die Hydroxycarbonsäuren bilden auch Salze mit zahlreichen Kationen, insbesondere Metallen und bevorzugt Alkalimetallen, wie Natrium oder Kalium. Die Natriumsalze werden am

130052/0860

05-08-81

3122499

- 34 -

stärksten bevorzugt.

Unter den erfindungsgemäßen Verbindungen sind die am stärksten bevorzugten Verbindungen M-4-Lacton, M-4-Natriumsalz, M-4-Methylester, IsoM-4'-Lacton, IsoM-4'-Natriumsalz und IsoM-4'-Methylester, wobei M-4-Natriumsalz besonders bevorzugt wird.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können durch enzymatische Hydroxylierung von ML-236B oder dessen Derivaten, speziell von ML-236B-Carbonsäure oder einem Salz oder Ester von ML-236B-Carbonsäure hergestellt werden.

Diese enzymatische Hydroxylierung kann als Teil des Metabolismus von ML-236B oder eines Derivats davon in Säugetieren durchgeführt werden, beispielsweise durch Verabreichung von ML-236B an ein geeignetes Tier, Gewinnen des Stoffwechselprodukts, beispielsweise Urin, und anschließende Abtrennung der gewünschten Verbindung bzw. Verbindungen gemäß der Erfindung aus dem Urin. Gemäß einer Alternativmethode kann anstelle des lebenden Tiers die Leber oder ein enzymhaltiger Extrakt aus der Leber verwendet werden.

Verfahren unter Anwendung des tierischen Metabolismus oder tierischer Produkte besitzen jedoch relativ niedere Produktionsleistung und sind schwierig in reproduzierbarer Weise durchzuführen. Es wird daher bevorzugt, Mikroorganismen oder enzymhaltige Extrakte aus Mikroorganismen einzusetzen.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird demnach vorzugsweise

130052/0860

unter Verwendung eines Mikroorganismus durchgeführt, der befähigt ist, ML-236B oder dessen Derivate in eine erfindungsgemäße Verbindung überzuführen oder unter Verwendung eines enzymhaltigen Extrakts aus einem solchen Mikroorganismus. Besonders bevorzugte Mikroorganismen sind Mikroorganismen der folgenden Genera: Mucor, Rhizopus, Zygorhynchus, Circinella, Actinomucor, Gongronella, Phycomyces, Martierella, Pycnoporus, Rhizoctonia, Absidia, Cunninghamella, Syncephalastrum und Streptomyces. Speziell die nachstehenden Spezies werden bevorzugt:

Absidia coerulea

Cunninghamella echinulata

Syncephalastrum racemosum

Streptomyces roseochromogenus

Mucor hiemalis f. hiemalis

Mucor bacilliformis

Mucor circinelloides f. circinelloides

Mucor hiemalis f. corticolus

Mucor dimorphosporus

Mucor fragilis

Mucor genevensis

Mucor globosus

Mucor circinelloides f. griseo-cyanus

Mucor heterosporus

Mucor spinescens

Rhizopus chinensis

Rhizopus circinans

Rhizopus arrhizus  
Zygorynchus moelleri  
Circinella muscae  
Circinella rigida  
Circinella umbellata  
Actinomucor elegans  
Phycomyces blakesleeana  
Martierella isabellina  
Gongronella butleri  
Pycnoporus coccineus  
Rhizoctonia solani  
Syncephalastrum nigricans  
Absidia glauca var. paradoxa

Unter den Stämmen der vorstehend genannten Spezies werden die nachstehenden besonders bevorzugt :

Absidia coerulea IFO-4423  
Cunninghamella echinulata IFO-4445  
Cunninghamella echinulata IFO-4444  
Cunninghamella echinulata ATCC-9244  
Syncephalastrum racemosum IFO-4814  
Syncephalastrum racemosum IFO-4828  
Streptomyces roseochromogenus NRRL-1233  
Streptomyces roseochromogenus IFO-3363  
Streptomyces roseochromogenus IFO-3411

05-06-81

3122499

- Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-5834  
Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-5303  
Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-8567  
Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-8449  
Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-8448  
Mucor hiemalis f. hiemalis IF0-8565  
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-117.08  
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-109.19  
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-200.28  
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-242.35  
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-110.19  
Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-201.65  
Mucor bacilliformis NRRL-2346  
Mucor circinelloides f. circinelloides IF0-4554  
Mucor circinelloides f. circinelloides IF0-5775  
Mucor hiemalis f. corticolus NRRL-12473  
Mucor dimorphosporus IF0-4556  
Mucor fragilis CBS-236.35  
Mucor genevensis IF0-4585  
Mucor globosus NRRL 12474  
Mucor circinelloides f. griseo-cyanus IF0-4563  
Mucor heterosporus NRRL-3154  
Mucor spinescens IAM-6071

130052/0869

3122499

- Rhizopus chinensis IFO-4772  
Rhizopus circinans ATCC-1225  
Rhizopus arrhizus ATCC-11145  
Zygorynchus moelleri IFO-4833  
Circinella muscae IFO-4457  
Circinella rigida NRRL-2341  
Circinella umbellata NRRL-1713  
Circinella umbellata IFO-4452  
Circinella umbellata IFO-5842  
Phycomyces blakesleeana NRRL-12475  
Martierella isabellina IFO-6739  
Gongronella butleri IFO-8080  
Pycnoporus coccineus NRRL-12476  
Rhizoctonia solani NRRL-12477  
Syncephalastrum nigricans NRRL-12478  
Syncephalastrum nigricans NRRL-12479  
Syncephalastrum nigricans NRRL-12480  
Absidia glauca var. paradoxa IFO-4431  
Actinomucor elegans ATCC-6476

130052/0888

05.06.81

3122499

Die vorstehend aufgezählten Mikroorganismen sind von den internationalen Hinterlegungsstellen, deren Abkürzungen zusammen mit den Hinterlegungsnummern angegeben sind, erhältlich. Dabei haben die genannten Abkürzungen (Codes) die nachstehende Bedeutung :

IFO = Institute for Fermentation, Osaka, Japan

NRRL = Agricultural Research Culture Collection, Illinois, USA

CBS = Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Netherlands

IAM = Institute of Applied Microbiology, Tokyo, Japan

ATCC = American Type Culture Collection, Maryland, USA

Unter den vorstehend angegebenen Spezies werden die folgenden besonders bevorzugt :

Absidia coerulea

Cunninghamella echinulata

Syncephalastrum racemosum

Mucor hiemalis f. hiemalis

Mucor bacilliformis

Mucor circinelloides f. circinelloides

Mucor hiemalis f. corticolus

Mucor dimorphosporus

Mucor fragilis

Mucor genevensis

Mucor globosus

Mucor circinelloides f. griseo-cyanus

Mucor heterosporus

130052/0869



Mucor spinescens

Pycnoporus coccineus

Rhizoctonia solani

Syncephalastrum nigricans

wobei die nachstehenden besonders bevorzugte Stämme dieser  
Spezies darstellen :

Absidia coerulea IFO-4423

Cunninghamella echinulata IFO-4445

Cunninghamella echinulata IFO-4444

Cunninghamella echinulata ATCC-9244

Syncephalastrum racemosum IFO-4814

Syncephalastrum racemosum IFO-4828

Mucor hiemalis f. hiemalis IFO-5834

Mucor hiemalis f. hiemalis IFO-5303

Mucor hiemalis f. hiemalis IFO-8567

Mucor hiemalis f. hiemalis IFO-8449

Mucor hiemalis f. hiemalis IFO-8448

Mucor hiemalis f. hiemalis IFO-8565

Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-117.08

Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-109.19

Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-200.28

Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-242.35

Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-110.19

Mucor hiemalis f. hiemalis CBS-201.65

Mucor bacilliformis NRRL-2346

Mucor circinelloides f. circinelloides IFO-4554

130052/0868

05.06.81

3122499

Mucor circinelloides f. circinelloides IFO-5775

Mucor hiemalis f. corticolus NRRL-12473

Mucor dimorphosporus IFO-4556

Mucor fragilis CBS-236.35

Mucor genevensis IFO-4585

Mucor globosus NRRL 12474

Mucor circinelloides f. griseo-cyanus IFO-4563

Mucor heterosporus NRRL-3154

Mucor spinescens IAM-6071

Pycnoporus coccineus NRRL-12476

Rhizoctonia solani NRRL-12477

Syncephalastrum nigricans NRRL-12478

Syncephalastrum nigricans NRRL-12479

Syncephalastrum nigricans NRRL-12480

Zur Herstellung von Verbindungen der Formeln (IV) und (V)  
und ihrer Salze werden die nachstehenden Spezies bevorzugt :

Mucor hiemalis f. hiemalis

Mucor circinelloides f. circinelloides

Mucor fragilis

Mucor genevensis

Mucor circinelloides f. griseo-cyanus

Pycnoporus coccineus

Rhizoctonia solani.

130052/0869

3122499

Zur Herstellung von Verbindungen der Formeln (VI) und (VIII) und ihrer Salze werden die Spezies *Syncephalastrum nigricans* und *Syncephalastrum racemosum* besonders bevorzugt.

Zur Herstellung von Verbindungen der Formeln (VIII) und (IX) und ihrer Salze werden die Spezies *Absidia coerulea* und *Cunninghamella echinulata* bevorzugt.

Unter allen vorstehend aufgeführten Spezies wird *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* besonders bevorzugt, da dieser Mikroorganismus befähigt ist, ML-236B und seine Derivate in einer Umwandlungsrate von 90 % oder sogar mehr in die gewünschten Verbindungen der Formel (I) überzuführen.

Die Umwandlung von ML-236B oder dessen Derivaten in Verbindungen der Formel (I) kann erreicht werden, indem ML-236B oder ein Derivat dieser Verbindung mit den in Form von vollständigen Zellen vorliegenden Mikroorganismen oder in manchen Fällen einem zellfreien Extrakt aus dem Mikroorganismus in Kontakt gehalten wird. Die Form der gebildeten Verbindung hängt von den Kulturbedingungen und der Form des verwendeten Mikroorganismus ab. Wenn beispielsweise die vollständigen Mikroorganismenzellen in Gegenwart von ML-236B oder dessen Derivaten gezüchtet werden, wird in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen, insbesondere dem pH-Wert, als Produkt die Carbonsäure, das Lacton oder das Alkalimetallsalz gebildet. Wenn andererseits ML-236B oder ein Derivat davon einfach mit einem verbliebenen Zellsystem oder mit einem zellfreien Extrakt in Berührung gehalten wird, so wird die erfindungsgemäße Verbindung in Form eines Alkalimetallsalzes erhalten.

Das Fortschreiten der Umwandlungsreaktion kann bestimmt werden, indem während des Verlaufs der Reaktion Proben aus dem Reaktionsgemisch entnommen werden, um den Umwandlungsgrad zu bestimmen. So kann beispielsweise das Vorliegen

130052/0869

05.05.81

3122499

von M-4-Lacton durch Flüssigphasenchromatographie nachgewiesen werden, wobei als Träger Micro Bonda Pac C<sub>18</sub> (hergestellt von Waters Co., USA) und als Lösungsmittel 62 %iges (Volumen/Volumen) wässriges Methanol in einer Rate von 1 ml/min angewendet wird. Beim Nachweis unter Ausnutzung seiner Ultraviolettabsorption bei 237 nm ergibt M-4 einen Peak bei einer Retentionszeit von 10 Minuten, was für den Nachweis ausgenutzt werden kann. Ähnliche Methoden sind zum Nachweis der anderen erfindungsgemäßen Verbindungen zugänglich.

Wenn die Mikroorganismen in Gegenwart von ML-236B oder eines Derivats davon zur Erzeugung der erfindungsgemäßen Verbindungen gezüchtet werden, werden die Kulturbedingungen und Kulturmedien unter Berücksichtigung des speziellen zu züchtenden Mikroorganismus gewählt. Da die Mikroorganismenspezies, die zur Anwendung bei dem erfindungsgemäßen Verfahren bestimmt sind, gut bekannte Mikroorganismen darstellen, sind auch die Kulturbedingungen und Kulturmedien zur Anwendung für diese Mikroorganismen gut bekannt.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können mit Hilfe üblicher Methoden aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt werden, beispielsweise durch Abfiltrieren der Mikroorganismenzellen (falls erforderlich) und anschließende Behandlung des verbleibenden Gemisches mit jeder beliebigen Kombination aus Dünnschichtchromatographie, Säulenchromatographie oder Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. Die verschiedenen erfindungsgemäßen Verbindungen können, falls zwei oder mehrere gemeinsam hergestellt werden, im Verlauf eines oder mehrerer dieser chromatographischen Reinigungsstufen voneinander getrennt werden.

Zusätzlich zu den erfindungsgemäßen Verbindungen kann in einigen Fällen auch eine Verbindung hergestellt werden, die von der Anmelderin als M-3 bezeichnet wurde und die unter

130052/0869

05.06.61  
3122499

dem Namen 3',5'-Dihydroxy-(dihydro-ML-236B) bekannt ist. Diese Verbindung ist in der deutschen Patentanmeldung P 31 16 066.2 mit dem Titel : "Hydronaphthalinderivate, ihre Herstellung und Verwendung" beschrieben. Auch diese Verbindung kann in gleicher Weise abgetrennt werden.

Es wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen in Konzentrationen, die den im Fall von ML-236B und gewissen anderen ähnlichen bekannten Verbindungen erforderlichen Konzentrationen entsprechen oder in manchen Fällen in bedeutend geringeren Konzentrationen eine 50 %ige Inhibierung der Biosynthese von Cholesterin verursachen. Die inhibierende Aktivität der erfindungsgemäßen Verbindungen, angegeben als Konzentration in µg/ml, die zu einer 50 %igen Inhibierung der Biosynthese von Cholesterin erforderlich ist (gemessen nach der Methode, die in "The Journal of Biological Chemistry, 234, 2835 (1959)" beschrieben ist), ist wie folgt :

M-4-Methylester	0,001
M-4-Natriumsalz	0,0008
M-4-Lacton	0,016
IsoM-4'-Methylester	0,007
IsoM-4'-Lacton	0,013
M-4'	0,019
M-4'-Natriumsalz	0,00049
ML-236B	0,01

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht.

130052/0868

05.06.81

3122499

# Beispiel 1

## Herstellung von M-4-Lacton

20 500 ml-Sakaguchikolben, von denen jeder 100 ml eines Mediums der nachstehend beschriebenen Zusammensetzung enthielt, wurden mit Sporen von *Absidia coerulea* IFO 4423 inokuliert. Die Kolben wurden einer Schüttelkultur bei 26°C mit 120 Ausschlägen pro Minute während 2 Tagen unterworfen. Am Ende dieser Dauer wurde das Natriumsalz von ML-236B zu jedem der Kolben bis zu einer Endkonzentration von 0,05 % (Gewicht/Volumen) zugefügt. Die Züchtung wurde bei 26°C und 120 Ausschlägen pro Minute (Apm) weitere 5 Tage durchgeführt.

Das Medium hatte folgende Zusammensetzung (in Gewicht/Volum-%):

Glucose	2,0 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,15 %
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,15 %
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,1 %
Pepton	0,1 %
Maisquellflüssigkeit	0,2 %
Hefeextrakt	0,1 %
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,001 %
Leitungswasser	Rest auf 100 %

(eingestellt auf pH 7,0)

Nach Beendigung der Züchtung wurde die Reaktionsflüssigkeit filtriert und der pH-Wert des Filtrats wurde mit Trifluoressigsäure auf 3 eingestellt. Das gebildete Gemisch wurde mit 3 1 l-Anteilen Äthylacetat extrahiert, wobei Extrakte mit einem Gehalt an M-4 erhalten wurde. Diese Verbindung zeigt einen Rf-Wert von 0,45 in der Dünnschichtchromatographie (TLC) (Platte : Merck Silicagel Art 5715; Lösungsmittel : Gemisch aus Benzol, Aceton und Essigsäure im Volumen-

130052/0889

3122499

verhältnis 50 : 50 : 3). Die kombinierten Extrakte wurden mit gesättigtem wässrigem Natriumchlorid gewaschen und dann wurde eine katalytische Menge an Trifluoressigsäure zur Lactonisierung zugesetzt. Das erhaltene Gemisch wurde dann mit einer 1 %igen (Gewicht/Volumen) wässrigen Lösung von Natriumbicarbonat gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde der präparativen Flüssigkeitschromatographie unterworfen, unter Anwendung von System 500 mit Hilfe einer Prep-PAK-500/C<sub>18</sub>-Hülse, hergestellt von Waters Associates (Prep PAK ist ein Warenzeichen). Nach Reinigung mit einem System aus 55 %igem (Volumen/Volumen) wässrigem Methanol wurden 50,1 mg M-4-Lacton erhalten.

M-4-Lacton hat folgende physikalische Eigenschaften.

1) Kernmagnetisches Resonanzspektrum :

Das NMR-Spektrum, das bei 60 MHz in Deuteriochloroform unter Verwendung von Tetramethylsilan als innerem Standard gemessen wurde, ist in Fig. 1 der beigefügten Zeichnungen gezeigt.

2) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Lösung in Methanol)  
 $\lambda_{\text{max nm}}$  : 230; 236,7; 244,6.

3) Infrarot-Absorptionsspektrum (flüssiger Film)  $\nu \text{ cm}^{-1}$  :  
3400, 2950, 1725

4) Dünnschichtchromatographie :

TLC-Platte : Merck Silicagel Art 5717;

Lösungsmittel : Benzol, Aceton, Essigsäure (Volumenverhältnis 50 : 50 : 3);

Rf-Wert : 0,62

Beispiel 2

48 mg M-4-Lacton wurden unter Anwendung der gleichen Verfahrensweise wie in Beispiel 1, jedoch unter Verwendung von *Cunninghamella echinulata* IFO 4445 hergestellt.

130052/0869

05.05.81

3122499

### Beispiel 3

30 mg M-4-Lacton wurden unter Anwendung der gleichen Verfahrensweise wie in Beispiel 1, jedoch unter Verwendung von *Streptomyces roseochromogenus* NRRL 1233 hergestellt.

### Beispiel 4

5 mg M-4-Lacton wurden unter Anwendung der gleichen Verfahrensweise wie in Beispiel 1, jedoch unter Verwendung von *Syncephalastrum racemosum* IFO 4814 hergestellt.

### Beispiel 5

6 mg M-4-Lacton wurden unter Anwendung der gleichen Verfahrensweise wie in Beispiel 1, jedoch unter Verwendung von *Syncephalastrum racemosum* IFO 4828 hergestellt.

### Beispiel 6

### Herstellung von IsoM-4'-Methylester

20 500 ml-Sakaguchikolben, die jeweils 100 ml eines Mediums der nachstehend beschriebenen Zusammensetzung enthielten, wurden mit Sporen von *Absidia coerulea* IFO 4423 angeimpft. Die Kolben wurden während 2 Tagen einer Schüttelkultur mit 120 Ausschlägen pro Minute (120 ApM) bei 26°C unterworfen. Nach Beendigung dieser Dauer wurde das Natriumsalz von ML-236B bis zu einer Endkonzentration von 0,05 % (Gewicht/Volumen) zu jedem der Kolben gegeben. Die Züchtung wurde dann bei 120 ApM und 26°C weitere 5 Tage fortgesetzt.

Das verwendete Medium hatte folgende Zusammensetzung (die Prozentangaben beziehen sich auf Gewicht/Volumen) :

130052/0868



3122499

Glucose	2,0 %
$K_2HPO_4$	0,15 %
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,15 %
$NH_4NO_3$	0,1 %
Pepton	0,1 %
Maisquellflüssigkeit	0,2 %
Hefeextrakt	0,1 %
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001 %
Leitungswasser	Ergänzung auf 100 %
(eingestellt auf pH 7,0)	

Nach Beendigung der Züchtung wurde die Reaktionsflüssigkeit filtriert und der pH-Wert des Filtrats wurde mit Trifluoressigsäure auf 3 eingestellt. Das erhaltene Gemisch wurde mit 3 l-Anteilen von Äthylacetat extrahiert, wobei Extrakte mit einem Gehalt an IsoM-4' erhalten wurden. Diese Verbindung hat in der Dünnschichtchromatographie (Platte : Merck Silicagel Art 5715; Lösungsmittel : ein Gemisch aus Benzol, Aceton und Essigsäure im Volumverhältnis 50 : 50 : 3) einen Rf-Wert von 0,45. Der Extrakt wurde mit einer gesättigten wässrigen Lösung von Natriumchlorid gewaschen und dann wurde eine ätherische Lösung von Diazomethan zugesetzt. Das Gemisch wurde 30 Minuten stehen gelassen und dann unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde auf eine Lobar-Kolonne (Merck Si 60, Größe A) aufgegeben und gereinigt, wobei als Lösungsmittelsystem ein Gemisch aus Benzol und Äthylacetat im Volumverhältnis 1 : 1 verwendet wurde. Auf diese Weise wurden 200 mg einer IsoM-4'-Methylester-Fraktion erhalten. Diese Fraktion wurde weiterhin an einer Lobar-Kolonne (Merck RP-8, Größe A) unter Verwendung einer 35 %igen (Volumen/Volumen) wässrigen Lösung von Acetonitril als Elutionsmittel gereinigt, wobei 78 mg reiner IsoM-4'-Methylester erhalten wurden, der folgende Eigenschaften zeigte :

130052/0869

3122499

1) Kernmagnetisches Resonanzspektrum :

Das NMR-Spektrum, das bei 100 MHz in Deuterochloroform unter Verwendung von Tetramethylsilan als innerem Standard gemessen wurde, ist in Fig. 2 der beigefügten Zeichnungen gezeigt.

2) Massenspektrum :

Die Messung erfolgte (nach der Silylierung mit N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid) mit Hilfe eines Massenspektrometers Typ D-300 der Nippon Electronics.

M/e : 654 ( $M^+$ ), 552, 462, 372, 272, 233, 231

3) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Lösung in Methanol)

$\lambda_{\text{max nm}}$  : 229, 234,8, 244,5

4) Infrarot-Absorptionsspektrum (flüssiger Film) :

Wie in Fig. 3 der beigefügten Zeichnungen gezeigt.

5) Dünnschichtchromatographie :

TLC-Platte : Merck Silicagel Art 5715;

Lösungsmittel : Benzol und Aceton im Volumverhältnis

1 : 1;

Rf-Wert : 0,88

Nach der vorstehend beschriebenen Verfahrensweise, jedoch durch Ersetzen von Diazomethan durch ein anderes geeignetes Diazoalkan ist es möglich, andere Ester von IsoM-4' herzustellen.

Beispiel 7

Herstellung von IsoM-4'-Lacton

Die in Beispiel 6 beschriebene Verfahrensweise wurde bis einschließlich der Extraktion mit Äthylacetat unter Bildung von IsoM-4' enthaltenden Extrakten wiederholt.

Die kombinierten Extrakte wurden mit einer gesättigten wässrigen Lösung von Natriumchlorid gewaschen und dann zur Trockene eingedampft, wobei das Lacton als Produkt erhalten

130052/0869

wurde. Der erhaltene Rückstand wurde auf eine Lobar-Kolonne (Merck Si 60, Größe A) aufgegeben und unter Verwendung eines Gemisches aus Benzol und Äthylacetat im Volumverhältnis 1 : 1 als Lösungsmittelsystem gereinigt. Dabei wurden 198 g IsoM-4'-Lacton erhalten. Dieses Produkt wurde unter Anwendung einer Lobar-Kolonne (Merck RP-8, Größe A) und Elution mit 35 %igem (Volumen/Volumen) wässrigem Acetonitril weiter gereinigt, wobei 82 mg reines IsoM-4'-Lacton mit folgenden Eigenschaften erhalten wurden :

1) Kernmagnetisches Resonanzspektrum :

Das bei 100 MHz in Deuteriochloroform und unter Anwendung von Tetramethylsilan als innerem Standard gemessene NMR-Spektrum ist in Fig. 4 der beigefügten Zeichnungen gezeigt.

2) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Lösung in Methanol)

$\lambda_{\text{max nm}}$  : 229, 234,8, 244, 5

3) Infrarot-Absorptionsspektrum (flüssiger Film) :

Wie in Fig. 5 der beigefügten Zeichnungen dargestellt.

Beispiel 8

63 mg IsoM-4'-Lacton wurden unter Anwendung der gleichen Verfahrensweise wie in Beispiel 7, jedoch unter Verwendung von *Cunninghamella echinulata* IFO 4445 hergestellt.

Beispiel 9

24 mg IsoM-4'-Lacton wurden mit Hilfe der in Beispiel 7 beschriebenen Verfahrensweise hergestellt, als Mikroorganismus wurde jedoch *Syncephalastrum racemosum* IFO 4814 verwendet.

#### Beispiel 10

35 mg IsoM-4'-Lacton wurden nach der gleichen Verfahrensweise wie in Beispiel 7, jedoch unter Verwendung von Syncephalosporum racemosum IFO 4828 hergestellt.

#### Beispiel 11

12 mg IsoM-4'-Lacton wurden nach der in Beispiel 7 beschriebenen Verfahrensweise hergestellt, wobei jedoch Streptomyces roseochromogenus NRRL 1233 als Mikroorganismus eingesetzt wurde.

#### Beispiel 12

#### Herstellung von IsoM-4'-Natriumsalz

In einer kleinen Menge Aceton wurden 10 mg IsoM-4'-Lacton gelöst. Zu der Lösung wurde eine äquivalente Menge an Natriumhydroxid gegeben und das Gemisch wurde 1 Stunde lang stehengelassen. Der pH-Wert des resultierenden Gemisches wurde mit 0,1 n Chlorwasserstoffsäure auf einen Wert von 8,0 eingestellt. Das Aceton wurde dann abdestilliert und der Rückstand wurde auf eine XAD-20-Kolonnen (etwa 20 ml) aufgegeben. Die Kolonne wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und dann mit 50 ml 50 %igem (Volumen/Volumen) wässrigem Aceton gewaschen. Das Aceton wurde erneut abdestilliert und der Rückstand wurde gefriergetrocknet, wobei 6 mg IsoM-4'-Natriumsalz mit den nachstehenden charakteristischen Daten erhalten wurden :

- 1) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Lösung in Methanol)  
 $\lambda_{\text{max nm}}$  : 229 (Schulter), 235, 245 (Schulter)
- 2) Infrarot-Absorptionsspektrum (KBr)  $\nu \text{ cm}^{-1}$  :  
 3400, 2850, 1710, 1580

3) Dünnschichtchromatographie :

TLC-Platte : Merck Silicagel Art 5715;

Lösungsmittel : Gemisch aus Benzol, Aceton und Essigsäure (Volumverhältnis 50 : 50 : 3);

Rf-Wert : 0,45

Beispiel 13

Herstellung von M-4-Methylester

20 500ml-Sakaguchi-Kolben, die jeweils 100 ml eines Mediums der gleichen Zusammensetzung wie in Beispiel 1 enthielten, wurden mit Sporen von *Absidia coerulea* IFO 4423 inokuliert. Die Kolben wurden 2 Tage lang einer Schüttelkultur bei 26°C mit 120 Ausschlägen pro Minute unterworfen. Dann wurde das Natriumsalz von ML-236B jedem der Kolben bis zu einer endgültigen Konzentration von 0,05 % (Gewicht/Volumen) zugefügt. Die Züchtung wurde dann weitere 5 Tage bei 26°C mit 120 A.p.M. fortgesetzt.

Nach Beendigung der Züchtung wurde die Reaktionsflüssigkeit filtriert und das Filtrat mit Trifluoressigsäure auf pH 3 eingestellt. Das erhaltene Gemisch wurde mit drei 1 l-Anteilen Äthylacetat extrahiert, wobei Extrakte gebildet wurden, die M-3, M-4 und IsoM-4' enthielten. Die beiden Substanzen M-4 und IsoM-4' zeigen in der Dünnschichtchromatographie (Platte : Merck Silicagel Art 5715; Lösungsmittel : Gemisch aus Benzol, Aceton und Essigsäure im Volumenverhältnis 50 : 50 : 3) einen Rf-Wert von 0,45. Die kombinierten Extrakte wurden mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, wonach eine ätherische Lösung von Diazomethan zugesetzt wurde. Das Gemisch wurde 30 Minuten stehengelassen und dann unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde auf eine Lobar-Kolonne (Merck Si 60, Größe A) aufgegeben und

05.05.81

3122499

die Reinigung erfolgte unter Anwendung eines Gemischs aus Benzol und Äthylacetat im Volumenverhältnis 1 : 1. Auf diese Weise wurden eine Fraktion, die IsoM-4'-Methylester enthielt und eine Fraktion, die M-4-Methylester enthielt, abgetrennt. Dabei wurden 185,3 mg der letzteren aktiven Fraktion erhalten, aus der 20 mg reiner M-4-Methylester als farbloses Öl durch Reinigung an einer Lobar-Kolonne (Merck RP-8, Größe A) unter Elution mit 35 %igem (Volumen/Volumen) wässrigem Acetonitril erhalten wurden.

M-4-Methylester zeigt folgende charakterische Daten :

1) Kernmagnetisches Resonanzspektrum :

Die Messung erfolgte bei 200 MHz in Deuteriochloroform unter Verwendung von Tetramethylsilan als innerem Standard.

δppm :

- 0,88 (3H, Triplett, J = 7,3 Hz);
- 0,89 (3H, Duplett, J = 6,5 Hz);
- 1,12 (3H, Duplett, J = 6,8 Hz);
- 1,1 - 1,7 (10H, Multiplett);
- 2,34 (1H, Sextuplett, J = 7Hz);
- 2,3 - 2,5 (2H, Multiplett);
- 2,49 (2H, Duplett, J = 6,4 Hz);
- 2,58 (1H, Multiplett);
- 3,72 (3H, Singulett);
- 3,78 (1H, Multiplett);
- 4,25 (1H, Quintuplett, J = 7 Hz);
- 4,4 (1H, Multiplett);
- 5,42 (1H, Multiplett);
- 5,56 (1H, Multiplett);

130052/0869

5,90 (1H, doppeltes Duplett,  $J = 9,8$  und  $5,6$  Hz);

5,99 (1H, Duplett,  $J = 9,8$  Hz).

2) Massenspektrum :

Die Messung erfolgte (nach der Silylierung mit N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid) unter Anwendung eines Massenspektrometers Typ D-300 der Nippon Electronics.

$M/e$  : 654 ( $M^+$ ), 552, 462, 372, 290, 272, 233, 231

3) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Lösung in Äthanol)

$\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}}$  : 230; 237,3; 246,4

4) Infrarot-Absorptionsspektrum (flüssiger Film)  $\nu \text{ cm}^{-1}$  :

3400, 2950, 1730

5) Dünnschichtchromatographie :

TLC-Platte : Merck Silicagel Art 5715;

Lösungsmittel : Benzol und Aceton (Volumverhältnis 1 : 1);

Rf-Wert : 0,88

Unter Anwendung der vorstehend beschriebenen Verfahrensweise, wobei jedoch Diazomethan durch ein anderes geeignetes Diazoalkan ersetzt wird, ist es möglich, andere Ester von M-4 herzustellen.

Beispiel 14

Herstellung der Natriumsalze von M-4 und IsoM-4'

Die in Beispiel 1 beschriebene Verfahrensweise wurde bis einschließlich der Filtration der Reaktionsflüssigkeit wiederholt, jedoch mit der Abänderung, daß  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anstelle von  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  verwendet wurde. Das Filtrat wurde dann an einer HP-20-Kolonne (hergestellt von Mitsubishi Chemical Industries) adsorbiert. Nach dem Waschen der Kolonne mit Wasser wurden Fraktionen, die M-4-Natriumsalz, IsoM-4'-Natriumsalz und M-3-Natriumsalz enthielten, mit 50 %igem

(Vol/Vol) wässrigem Aceton eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden gefriergetrocknet, wobei 830 ml eines gefriergetrockneten Produkts erhalten wurde, welches dann durch wiederholte Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (Kolonne : Mikro Bondapak C<sub>18</sub>; 40 %iges (Vol/Vol) Methanol, 1 ml/min) gereinigt wurde, wobei 32 mg M-4-Natriumsalz und 280 mg IsoM-4'-Natriumsalz erhalten wurden.

Die Eigenschaften des IsoM-4'-Natriumsalzes waren identisch mit denen des Produkts gemäß Beispiel 12. Die charakteristischen Daten des M-4-Natriumsalzes sind nachstehend angegeben :

1) Kernmagnetisches Resonanzspektrum :

Die Messung erfolgte bei 200 MHz in Deuteromethanol unter Verwendung von Tetramethylsilan als innerem Standard.

$\delta$  ppm :

0,91 (3H, Triplett, J = 7,5 Hz);

0,92 (3H, Duplett, J = 7 Hz);

1,12 (3H, Duplett, J = 7 Hz);

1,1 - 1,8 (10H, Multiplett);

2,25 (1H, doppeltes Duplett, J = 15 und 7,6 Hz);

2,34 (1H, doppeltes Duplett, J = 15 und 5,5 Hz);

2,2 - 2,4 (3H, Multiplett);

2,48 (1H, Multiplett);

3,68 (1H, Multiplett);

4,07 (1H, Multiplett);

4,28 (1H, Multiplett);

5,36 (1H, Multiplett);



3122499

5,48 (1H, doppeltes Duplett,  $J = 3$  und  $2$  Hz);

5,88 (1H, doppeltes Duplett,  $J = 9,6$  und  $5,3$  Hz);

5,98 (1H, Duplett,  $J = 9,8$  Hz).

2) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Lösung in Methanol)

$\lambda_{\text{max nm}}$  : 230,0; 237,2; 245,0

3) Infrarot-Absorptionsspektrum (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  :

3400, 2900, 1725, 1580

4) Dünnschichtchromatographie :

TLC-Platte : Merck Silicagel Art 5715;

Lösungsmittel : Benzol, Aceton und Essigsäure (Volumverhältnis 50 : 50 : 3);

Rf-Wert : 0,45

#### Beispiel 15

Unter Anwendung der gleichen Verfahrensweise wie in Beispiel 13, jedoch mit Hilfe von *Cunninghamella echinulata* IFO 4445, wurden 18 mg M-4-Methylester hergestellt.

#### Beispiel 16

33 mg M-4-Methylester wurden unter Anwendung der gleichen Verfahrensweise wie in Beispiel 13, jedoch unter Verwendung von *Streptomyces roseochromogenus* NRRL 1233 hergestellt.

#### Beispiel 17

12 mg M-4-Methylester wurden unter Anwendung der gleichen Verfahrensweise wie in Beispiel 13, jedoch unter Verwendung von *Syncephalastrum racemosum* IFO 4814 hergestellt.

130052/0860

3122499

Beispiel 18

16 mg M-4-Methylester wurden unter Anwendung der gleichen Verfahrensweise wie in Beispiel 13, jedoch unter Verwendung von Syncephalastrum racemosum IFO 4828 als Mikroorganismus hergestellt.

Beispiel 19

Herstellung von M-4-Methylester

An fünf männliche Beagles mit einem Durchschnittsgewicht von 10 kg wurde ML-236B in einer Dosis von 200 mg/kg/Tag verabreicht und der Urin der Hunde wurde 3 Tage lang gesammelt. 3 l des gesammelten Urins wurden durch eine 500 ml-XAD-2-Kolonne geleitet und diese mit 500 ml 50 %igem (Vol/Vol) wässrigem Aceton eluiert. Nach dem Abdestillieren des Acetons unter vermindertem Druck wurde der pH-Wert der verbleibenden Flüssigkeit durch Zusatz von Trifluoressigsäure auf 3 eingestellt. Das Gemisch wurde dann 3 mal mit jeweils 1 l Äthylacetat extrahiert, wobei M-4 erhalten wurde. Diese Verbindung zeigt bei der Dünnschichtchromatographie (TLC-Platte : Silicagel Art 5715 der Merck und Co., Inc. ; Lösungsmittel : Gemisch aus Benzol, Aceton und Essigsäure, Volumverhältnis 50 : 50 : 3) einen Rf-Wert von 0,45. Der Extrakt wurde mit einer gesättigten wässrigen Lösung von Natriumchlorid gewaschen und nach der Zugabe einer ätherischen Lösung von Diazomethan 30 Minuten lang stehen gelassen. Er wurde dann unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 10 ml einer 55 %igen (Vol/Vol) wässrigen MethanolLösung gelöst und durch einen Kolonnenchromatograph (Produkt der Merck und Co., Inc. RP-8, Größe B) geleitet. Nach dem Durchleiten von 200 ml einer 55 %igen (Vol/Vol) wässrigen MethanolLösung wurde die Kolonne mit einer 60 %igen (Vol/Vol) wässrigen MethanolLösung eluiert. Die ersten 240 ml des Eluats wurden verworfen und die nächsten 120 ml wurden aufgefangen. Diese Fraktion

130052/0869

wurde zur Trockene eingedampft und der Rückstand wurde in 2,5 ml einer 65 %igen (Vol/Vol) wässrigen Methanollösung gelöst und durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (JASCO-Trirotar, Kolonne :  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>) gereinigt. Der Anteil, der den vierten Peak zeigte, wurde abgetrennt und das Lösungsmittel wurde abdestilliert, wobei M-4-Methylester als farbloses Öl mit den in Beispiel 13 gezeigten Eigenschaften erhalten wurde. Es wurden 4 mg des gewünschten Produkts erhalten.

#### Beispiel 20

##### Herstellung von M-4

In diesem Beispiel wurde homogenisierte Kaninchenleber angewendet, um M-4 aus ML-236B zu erhalten.

##### (a) Enzymlösung

Drei Volumteile einer 1,15 % (Gew/Vol) Kaliumchlorid und 10 mM Phosphat enthaltenden Pufferlösung (pH 7,4) wurden zu einem Volumteil Kaninchenleber gegeben und das Gemisch wurde homogenisiert. Das homogenisierte Gemisch wurde dann 20 Minuten bei 9000 G zentrifugiert und die überstehende Fraktion wurde als Enzymlösung entnommen.

##### (b) Lösung des Cofaktors

Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat

(Beta-Typ) in der reduzierten Form

(NADPH)

3 mg

MgCl<sub>2</sub>-Lösung (508 mg/10 ml)

0,1 ml

1,15 % (Gew/Vol) KCl-Lösung

0,3 ml

0,2 m Phosphatpufferlösung (pH 7,4)

0,6 ml

Die vorstehenden Substanzen wurden bis zu einem Gesamtvolumen von 1 ml vermischt, um die Cofaktor-Lösung zu erhalten.

3122499

(c) Reaktionslösung

80 µl der vorstehend beschriebenen Enzymlösung, 20 µl der vorstehend erhaltenen Cofaktor-Lösung und 2 µl einer methanolischen Lösung von ML-236B wurden vermischt, so daß eine Endkonzentration an ML-236B von 1 mM erhalten wurde. Die resultierende Lösung wurde 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. M-4 wurde in dem Reaktionsgemisch gebildet und wurde durch Dünnschichtchromatographie (unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 19) identifiziert.

Beispiel 21

Herstellung von M-4-Natriumsalz

2 mg M-4-Methylester wurden in 1 ml einer 0,1 n wässrigen Lösung von Natriumchlorid gelöst und eine Stunde lang bei 30°C hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit 1 ml Chloroform gewaschen und die erhaltene wässrige Phase wurde mit 0,1 n Chlorwasserstoffsäure auf pH 8 eingestellt und dann durch eine XAD-2-Kolonne (etwa 5 ml) geleitet. Die Kolonne wurde mit 20 ml destilliertem Wasser gewaschen und das gewünschte Produkt wurde mit 15 ml 50 %igem (Vol/Vol) wässrigem Aceton eluiert. Das Aceton wurde aus dem Eluat abdestilliert. Durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie wurde bestätigt, daß der Rückstand einen einzigen Peak ergab (Retentionszeit 13 Minuten, Elution mit 40 %igem (Vol/Vol) wässrigem Methanol mit 1 ml/min). Der Rückstand wurde dann gefriergetrocknet, wobei 0,8 mg M-4-Na-Salz erhalten wurde, das die gleichen Eigenschaften wie das Produkt des Beispiels 14 zeigte.

Beispiel 22

Herstellung von M-4-Methylester

20 500ml-Erlenmeyer-Kolben, die jeweils 100 ml eines

130052/0869

3122499

Mediums der nachstehend angegebenen Zusammensetzung enthielten, wurden jeweils mit Sporen von *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* IFO-5834 inokuliert. Das Inokulum wurde einer Schüttelkultur bei 26°C und 220 Ausschlägen pro Minuten unterworfen. Nach 4 Tagen wurde ML-236B bis zu einer Endkonzentration von 0,05 % (Gew/Vol) zugefügt und die Züchtung erfolgte bei 26°C und 220 A.p.M. während weiterer 6 Tage.

Das Medium hatte folgende Zusammensetzung (Prozentangaben in Gew/Vol) :

Glucose	1,0 %
Pepton	0,2 %
Fleischextrakt	0,1 %
Hefeextrakt	0,1 %
Maisquellflüssigkeit	0,3 %
Leitungswasser	Ergänzung auf 100 %

(pH nicht eingestellt).

Nach Beendigung der Züchtung wurde das Filtrat mit Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Das Gemisch wurde dann 3 mal mit jeweils 100 ml Äthylacetat extrahiert. Dabei wurde eine M-4 enthaltende Fraktion erhalten. M-4 zeigt einen Rf-Wert von 0,45 bei der Dünnschichtchromatographie (Platte : Merck Silicagel Art 5715; Lösungsmittel : Gemisch aus Benzol, Aceton und Essigsäure im Volumverhältnis 50 : 50 : 3). Die Umwandlungsrate betrug 90 %. Dieser Extrakt wurde mit einer gesättigten wässrigen Lösung von Natriumchlorid gewaschen, wonach eine ätherische Lösung von Diazomethan zugesetzt wurde. Das erhaltene Gemisch wurde 30 Minuten stehengelassen und dann unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde auf eine Lobar-Kolonne aufgegeben (Merck Si 60, Größe A) und mit einem Gemisch aus Benzol und Äthylacetat im Volumverhältnis 1 : 1 gereinigt. Auf diese Weise

130052/0869

05.08.80

3122499

wurden etwa 600 mg M-4-Methylester erhalten, der die gleichen Eigenschaften wie das Produkt des Beispiels 13 hatte.

#### Beispiel 23

##### Herstellung von M-4-Lacton

Die in Beispiel 22 beschriebene Verfahrensweise wurde bis zu und einschließlich der Stufe der Wäsche der drei Äthylacetatextrakte mit einer gesättigten wässrigen Lösung von Natriumchlorid wiederholt. Die gebildete Lösung wurde dann zur Trockene eingedampft, wobei das Lacton als Produkt erhalten wurde. Das Produkt wurde aus Äthylacetat umkristallisiert, wobei etwa 560 mg (56 %) M-4-Lacton erhalten wurden, das die gleichen Eigenschaften wie das Produkt des Beispiels 1 zeigte.

#### Beispiel 24

##### Herstellung von M-4-Natriumsalz

Die in Beispiel 22 beschriebene Verfahrensweise wurde wiederholt, wobei 1,9 l des Filtrats aus der Umwandlungsreaktion erhalten wurden. Das Filtrat wurde 3 mal mit jeweils 1 l Äthylacetat extrahiert, wobei M-4 enthaltende Fraktionen gebildet wurden. Diese Fraktionen wurden unmittelbar in eine 5 %ige (Gew/Vol) wässrige Lösung von Natriumbicarbonat überführt, wobei eine Fraktion gebildet wurde, die das M-4-Natriumsalz enthielt. Die M-4-Natriumsalz enthaltende Fraktion wurde mit 2 n Chlorwasserstoffsäure auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und an einer HP-20-Kolonne (hergestellt von Mitsubishi Chemical Industries) adsorbiert. Durch Waschen mit Wasser und Elution mit 50 %igem (Vol/Vol) wässrigem Aceton wurde eine das M-4-Natriumsalz enthaltende Fraktion erhalten, aus der dann 570 mg (52 %)

130052/0869

eines gefriergetrockneten Produkts hergestellt wurden, das die in Beispiel 14 beschriebenen charakteristischen Eigenschaften zeigte.

Beispiel 25

Herstellung von M-4

Die in Beispiel 22 beschriebene Verfahrensweise wurde wiederholt, mit der Abänderung, daß die nachstehend angegebenen Mikroorganismen verwendet wurden. Die Umwandlung in M-4 ist durch die daneben angezeigten Abkürzungen angegeben :

<u>Mikroorganismus</u>	<u>Umwandlung in M-4</u>
<u>Mucor hiemalis f. hiemalis</u> IFO-5303	+4
<u>Mucor hiemalis f. hiemalis</u> IFO-8567	+4
<u>Mucor hiemalis f. hiemalis</u> IFO-8449	+4
<u>Mucor hiemalis f. hiemalis</u> IFO-8448	+4
<u>Mucor hiemalis f. hiemalis</u> IFO-8565	+4
<u>Mucor hiemalis f. hiemalis</u> CBS-117.08	+4
<u>Mucor hiemalis f. hiemalis</u> CBS-109.19	+4
<u>Mucor hiemalis f. hiemalis</u> CBS-200.28	+4
<u>Mucor hiemalis f. hiemalis</u> CBS-242.35	+4
<u>Mucor hiemalis f. hiemalis</u> CBS-110.19	+4
<u>Mucor hiemalis f. hiemalis</u> CBS-201.65	+4

3122499

<u>Mucor bacilliformis</u> NRRL-2346	Spuren
<u>Mucor circinelloides</u> f. <u>circinelloides</u> IFO-4554	Spuren +1
<u>Mucor circinelloides</u> f. <u>circinelloides</u> IFO-5775	+1
<u>Mucor hiemalis</u> f. <u>corticulus</u> NRRL-12473	Spuren
<u>Mucor dimorphosporus</u> IFO-4556	Spuren
<u>Mucor fragilis</u> CBS-236.35	+1
<u>Mucor genevensis</u> IFO-4585	+1
<u>Mucor globosus</u> NRRL-12474	Spuren
<u>Mucor circinelloides</u> f. <u>griseo-cyanus</u> IFO-4563	+1
<u>Mucor heterosporus</u> NRRL-3154	Spuren
<u>Mucor spinescens</u> IAM-6071	Spuren
<u>Mucor chinensis</u> IFO-4772	Spuren
<u>Rhizopus circinans</u> ATCC-1225	+1
<u>Rhizopus arrhizus</u> ATCC-11145	+1
<u>Zygorynchus moelleri</u> IFO-4833	+1
<u>Circinella muscae</u> IFO-4457	+1
<u>Circinella rigida</u> NRRL-2341	Spuren
<u>Circinella umbellata</u> NRRL-1713	+1
<u>Circinella umbellata</u> IFO-4452	+1
<u>Circinella umbellata</u> IFO-5842	+1
<u>Actinomucor elegans</u> ATCC-6476	+1
<u>Phycomyces blakesleeana</u> NRRL-12475	Spuren

130052/0869



3122499

<u>Martierella isabellina</u> IFO-6739	Spuren
<u>Gongronella butleri</u> IFO-8080	+1
<u>Pycnopus coccineus</u> NRRL-12476	+3
<u>Rhizoctonia solani</u> NRRL-12477	+2

Die Abkürzungen, welche die Umwandlung in M-4 angeben, haben folgende Bedeutung :

Spuren	=	0,5 % oder weniger
+1	=	0,5 - 5 %
+2	=	5,0 - 10,0 %
+3	=	10,0 - 30,0 %
+4	=	70,0 - 90,0 %

#### Beispiel 26

##### Herstellung von IsoM-4'-Lacton

20 500 ml-Sakaguchi-Kolben, die jeweils 100 ml eines Mediums der in Beispiel 22 beschriebenen Zusammensetzung enthielten, wurden mit Sporen von *Circinella muscae* IFO-4457 inokuliert. Das Inokulum wurde einer Schüttelkultur bei 26°C mit 120 A.p.M. unterworfen. Nach 4 Tagen wurde ML-236B bis zu einer Endkonzentration von 0,05 % (Gew/Vol) zugefügt und die Züchtung wurde weitere 6 Tage bei 26°C und 120 A.p.M. vorgenommen.

Nach Beendigung der Züchtung wurde das Reaktionsgemisch der Umwandlung filtriert und das Filtrat wurde mit Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt. Das Gemisch wurde dann 3 mal jeweils mit 1 l Äthylacetat extrahiert, wobei eine IsoM-4' enthaltende Fraktion erhalten wurde. Dieser Extrakt wurde mit einer gesättigten wässrigen Lösung von

130052/0869

Natriumchlorid gewaschen und dann zur Trockene eingedampft. Auf diese Weise wurde ein Lacton als Produkt gebildet. Der Rückstand wurde auf eine Lobar-Kolonne (Merck Si 60, Größe A) aufgegeben und mit einem Äthylacetat-System gereinigt, wobei 12 mg IsoM-4'-Lacton mit den in Beispiel 7 beschriebenen Eigenschaften erhalten wurden.

### Beispiel 27

#### Herstellung von M-4'-Lacton

20 500 ml-Erlenmeyer-Kolben, die jeweils 100 ml eines Mediums der nachstehend gezeigten Zusammensetzung enthielten, wurden jeweils mit Sporen von *Syncephalastrum nigricans* NRRL-12478 angeimpft. Das Inokulum wurde dann einer Schüttelkultur bei 26°C und 220 A.p.M. unterworfen. Nach 3 Tagen wurde ML-236B bis zu einer Endkonzentration von 0,05 % (Gew/Vol) zugesetzt und die Züchtung erfolgte bei 26°C und 220 A.p.M.

Das verwendete Medium hatte folgende Zusammensetzung (Prozentangaben in Gew/Vol) :

Glucose	1 %
Pepton	0,2 %
Fleischextrakt	0,1 %
Hefeextrakt	0,1 %
Maisquellflüssigkeit	0,3 %

(pH nicht eingestellt)

Nach Beendigung der Züchtung wurde das durch die Umwandlung erhaltene Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat wurde mit Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Das Gemisch wurde dann 3 mal mit jeweils 1 l Äthylacetat extrahiert, wobei eine M-4' enthaltende Fraktion gebildet

wurde, die in der Dünnschichtchromatographie (Platte : Merck Silicagel Art 5715; Lösungsmittel : Gemisch aus Benzol, Aceton und Essigsäure im Volumverhältnis 50 : 50 : 3) einen Rf-Wert von 0,46 zeigte. Dieser Extrakt wurde mit einer gesättigten wässrigen Natriumchloridlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und durch Zugabe einer katalytischen Menge Trifluoressigsäure lactonisiert. Das gebildete Gemisch wurde dann mit einer 5 %igen (Gew/Vol) wässrigen Lösung von Natriumbicarbonat gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat entwässert und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde aus Äthylacetat umkristallisiert, wobei etwa 180 mg M-4'-Lacton erhalten wurden, das folgende physikalische Eigenschaften zeigte :

1) Kernmagnetisches Resonanzspektrum :

Gemessen in Deuteriochloroform bei 100 MHz unter Verwendung von Tetramethylsilan als innerem Standard.

$\delta$  ppm :

- 6,01 (1H, Duplett);
- 5,90 (1H, Quadruplett);
- 5,75 (1H, Multiplett);
- 5,50 (1H, Multiplett);
- 4,60 (1H, Multiplett);
- 4,25 (1H, Multiplett).

2) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Methanol)  $\lambda_{\max}$  nm :

230, 237, 245

3) Infrarot-Absorptionsspektrum (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup> :

3500, 1720

4) Massenspektrum :

M/e : 406 (M<sup>+</sup>), 304, 286

5) Optische Drehung :

$[\alpha]_D^{25} = +310,9^\circ$  (c = 0,66, Methanol)

- 6) Schmelzpunkt :  
141 - 143 °C
- 7) Elementaranalyse :  
Berechnet : C: 67,95 %; H: 8,43 %  
Gefunden : C: 68,05 %; H: 8,37 %
- 8) Dünnschichtchromatographie :  
TLC-Platte : Merck Silicagel Art 5715  
Lösungsmittel : Benzol/Aceton (Volumverhältnis 1 : 1)  
Rf-Wert : 0,64

Beispiel 28

Herstellung von M-4'-Natriumsalz

Unter Nacharbeitung im wesentlichen des gleichen Züchtungsverfahrens wie in Beispiel 27 wurde ein Umwandlungsreaktionsgemisch hergestellt.

Nach Beendigung der Züchtung wurde das durch die Umwandlung erhaltene Reaktionsgemisch filtriert und der pH-Wert des Filtrats wurde mit Trifluoressigsäure auf einen Wert von 3 eingestellt. Das Filtrat wurde dann 3 mal mit jeweils 1 l Äthylacetat extrahiert, wobei eine M-4' enthaltende Fraktion gebildet wurde, die mit einer gesättigten wässrigen Lösung von Natriumchlorid gewaschen und unmittelbar danach in eine 5 %ige (Gew/Vol) wässrige Lösung von Natriumbicarbonat gegeben wurde. Auf diese Weise wurde eine das M-4'-Natriumsalz enthaltende Fraktion gebildet. Die so erhaltene wässrige Schicht wurde mit 0,1 n Chlorwasserstoffsäure auf pH 8,0 eingestellt und an einer Diaion HP 20-Harz-Kolonne (Produkt der Mitsubishi Chemical Industries) adsorbiert. Die Elution erfolgte mit 50 %igem (Vol/Vol) wässrigem Aceton. Das Aceton wurde abdestilliert und der Rückstand wurde gefriergetrocknet, wobei 1,41 g M-4'-Natriumsalz mit den nachstehenden physikalischen Eigenschaften erhalten wurden :

- 1) Kernmagnetisches Resonanzspektrum :  
Gemessen in Deuteriochloroform bei 60 MHz unter Verwendung von Tetramethylsilan als innerem Standard.

$\delta$  ppm :

- 6,00 (1H, Duplett);  
5,95 (1H, Quadruplett);  
5,70 (1H, breites Singulett);  
5,50 (1H, breites Singulett).

- 2) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Methanol)  $\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}}$  :  
230, 238, 246

- 3) Infrarot-Absorptionsspektrum (KBr)  $\nu \text{ cm}^{-1}$  :  
3400, 2900, 1680

#### Beispiel 29

##### Herstellung von M-4'-Methylester

Unter Nacharbeitung im wesentlichen des gleichen Züchtungsverfahrens wie in Beispiel 27 wurde ein Umwandlungsreaktionsgemisch erhalten.

Nach Beendigung der Züchtung wurde das Umwandlungsgemisch filtriert und das Filtrat mit Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Es wurde dann 3 mal mit jeweils 1 l Äthylacetat extrahiert. Die kombinierten Extrakte wurden mit einer gesättigten wässrigen Natriumchloridlösung gewaschen, wonach eine ätherische Lösung von Diazomethan zugesetzt wurde. Das gebildete Gemisch wurde 30 Minuten stehen gelassen und dann unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde unter Verwendung einer Lobar-Kolonne (Merck RP-8, Größe A) und unter Anwendung eines Gemisches aus Benzol und Aceton im Volumverhältnis 1 : 1 als

3122499

Entwicklungslösungsmittel gereinigt. Auf diese Weise wurden 150 mg M-4-Methylester als farblose ölige Substanz erhalten, welche die nachstehenden Eigenschaften zeigte :

1) Kernmagnetisches Resonanzspektrum :

Gemessen in Deuteriochloroform bei 60 MHz unter Verwendung von Tetramethylsilan als innerem Standard.

$\delta$ ppm :

6,01 (1H, Duplett);

5,90 (1H, Quadruplett);

5,75 (1H, breites Singulett);

5,50 (1H, breites Singulett);

3,70 (3H, Singulett).

2) Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Methanol)  $\lambda_{\max}^{\text{nm}}$  :

230, 238, 246

3) Infrarot-Absorptionsspektrum (flüssiger Film)  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  :

3400, 1730

4) Massenanalyse :

Die Messung erfolgte nach der Silylierung mit N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid unter Anwendung eines Massenspektrometers Typ D-300 der Nippon Electronics.

M/e : 654 ( $\text{M}^+$ )

130052/0869

71

DEA-13 572

3122499

Fig 3

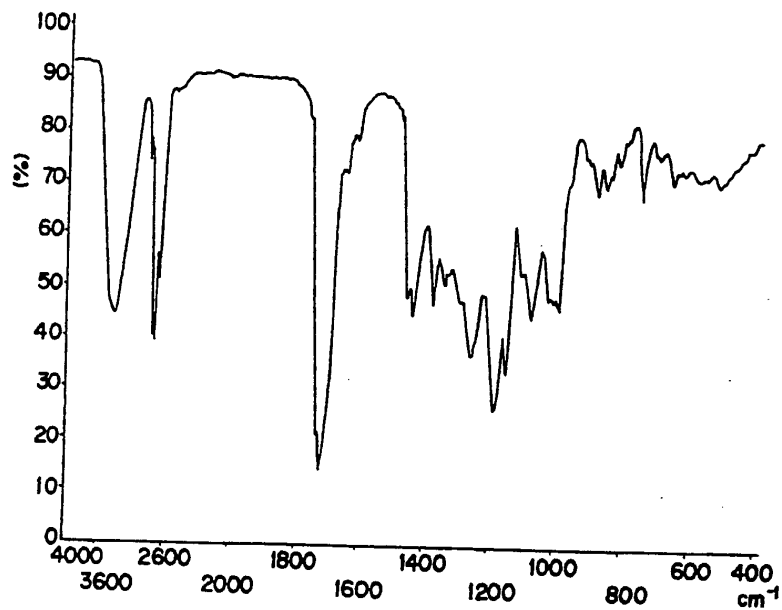
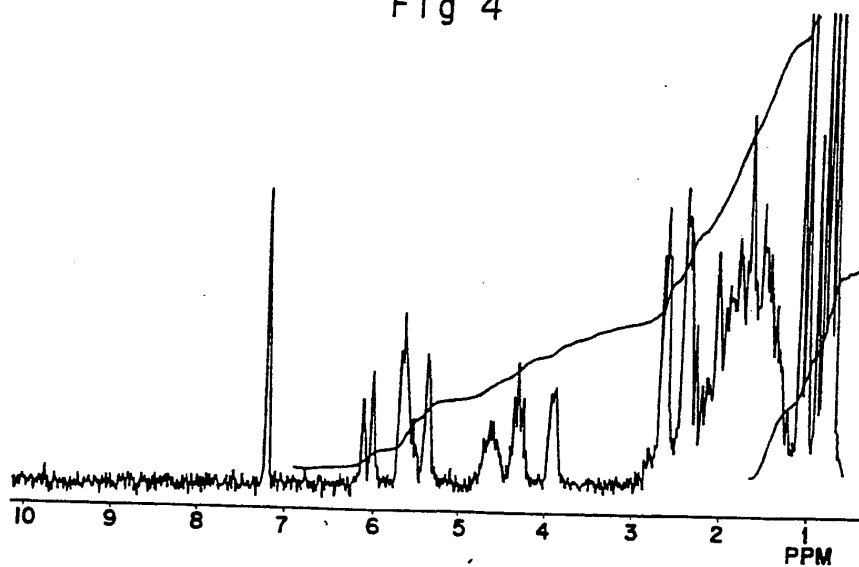


Fig 4



130052/0869

DEA-13 579

Numm r: 3122499  
Int. Cl.<sup>3</sup>: C07 69/33  
Anmeldetag: 5. Juni 1981  
Off nlegungstag: 24. Dezember 1981

73.  
3122499

Fig 1

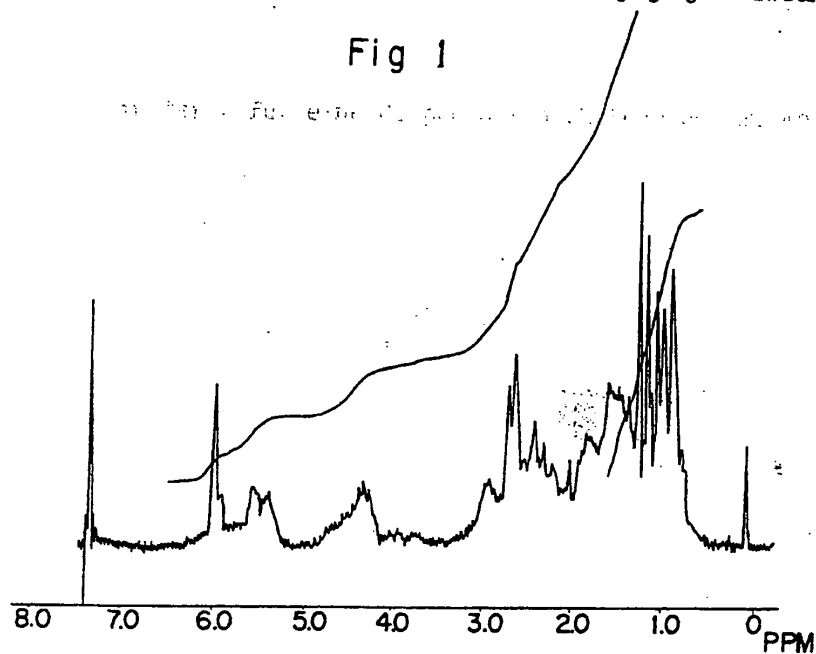
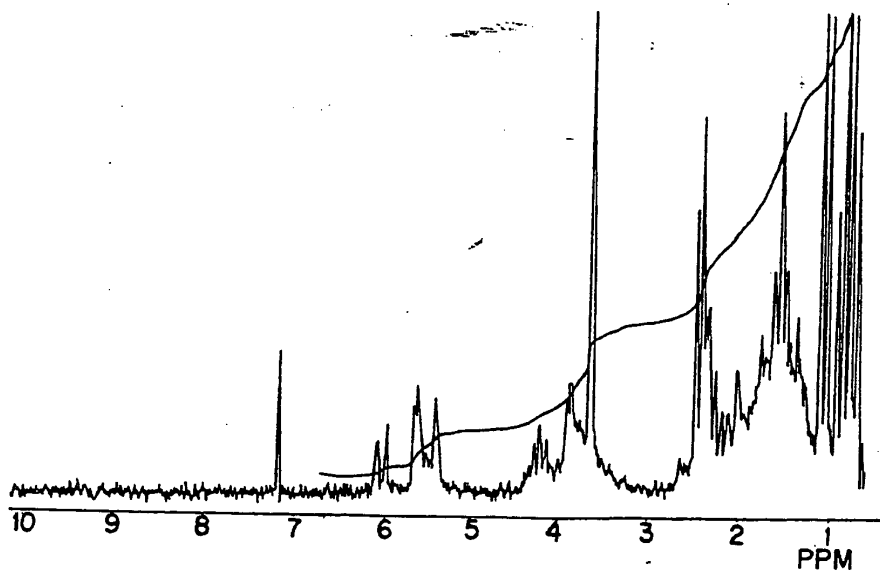


Fig 2



130052/0869



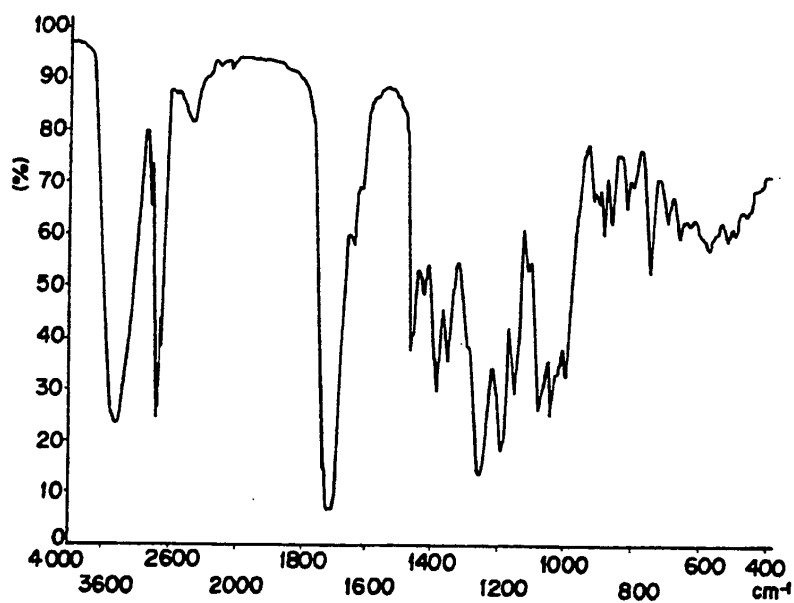
70.  
Leerseite

72

DEA-13 579

3122499

Fig 5



130052/0869